

Tierexperimentelle Untersuchungen über die Antigenizität
von menschlichen Gehörknöchelchen und Trommelfellen
im xenogenen System

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München.

vorgelegt von
Ulrich Reichardt
1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

1. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. E. Kastenbauer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Brendel
Dekan:	Prof. Dr. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	12.10.1976



DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

I N H A L T:

A. EINLEITUNG: Geschichtlicher Rückblick

B. HAUPTTEIL:

I. Die Transplantation von homostatischem Stützgewebe

1. Die Transplantation von Knochen

2. Die Transplantation von allogenem Bindegewebe (Trommelfell)

II. Eigene Untersuchungen:

1. Problemstellung

2. Abkürzungen

3. Die Transplantation von menschlichen Gehörknöchelchen auf das Kaninchen

4. Die Transplantation von menschlichen Trommelfellen auf das Kaninchen

5. Biochemische Untersuchungen der menschlichen Gehörknöchelchen und Trommelfelle

6. Experimenteller Teil

A. Technik der Absorbktion

α) Absorbktion mit Erythrocyten

β) Absorbktion mit Humanserum

γ) Absorbktion mit Leber

B. Untersuchung der Antiseren im "Ouchterlony"

α) vor Absorbktion

β) nach Absorbktion

C. Untersuchung der Antiseren im Hämagglutinationstest

D. Histologische Ergebnisse

C. SCHLUSSTEIL:

1. Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse

2. Schlussfolgerung

D. LITERATURVERZEICHNIS

A. Einleitung:

Die Transplantation verschiedener Anteile des Schalleitungsapparates von Mensch auf Mensch hat in den letzten 10 Jahren trotz der meist optimistischen Berichte der Operateure nur eine verhältnismässig geringe Verbreitung gefunden. Dies mag seine Ursache darin haben, daß nahezu ausschließlich über klinische und funktionell gute Ergebnisse dieser Eingriffe berichtet wurde, ohne genauere Angaben über immunologische und histiologische Untersuchungen machen zu können WEICHSELBAUMER 1961, TOBECK 1962, GLANNINGER 1967, BETOW 1970, MARQUET 1970, ANTONI-CANDELA 1970, DEHM 1970, MAWSON 1970, HOUSE 1970, DAWKINS 1970, PLESTER 1970, BRANDOW 1970, AUSTIN 1970, LACHER 1970, PRADES 1970, HILDYARD 1970).

Dieser Umstand bedingte eine gewisse Zurückhaltung dieser Methode gegenüber, da man doch nach der Transplantation frischer und konservierter Mittelohranteile mit entzündlichen und immunologischen Reaktionen rechnen muß, die ein funktionell unbefriedigendes Resultat der gehörverbessernden Operation zur Folge haben. Zunehmend zeigten sich bei Nachoperationen solcher Patienten durch andere Ohrchirurgen massive Verwachsungen und Fixierungen der Transplantate innerhalb der Paukenhöhle, deren Folge Schallleitungsschwerhörigkeiten verschieden starken Ausmasses waren. Bei der Verwendung von allogenen Trommelfelltransplantationen kam es in einem weit höheren Prozentsatz zu Rezidiv-Perforationen als bei Myringoplastiken mit der Temporalis-Fascie (MAWSON, AUSTIN 1970, KASTENBAUER 1972).

Verfolgen wir die Entwicklung der letzten 20 - 25 Jahre, so läßt sich feststellen, daß die gehörverbessernden Operationen große Fortschritte machten, wobei Wullstein und Zöllner Wegbereiter dieser Chirurgie waren. Über das Vollhaut-Transplantat bei der Trommelfell-Plastik kam man

über die Myringoplastik mit der Venenwandung (TABB 1961, AUSTIN 1961, HECK 1961, KRAMER 1961) zur Paukenabdeckung mit der Fascie des Musculus temporalis (STORRS 1961, HEERMANN 1962, SCHOBEL 1963, KLEY 1963, B ANDTLOW 1967), die bei uns bis zum heutigen Tage die besten Ergebnisse erbracht hat. Nebenbei liefen stets Versuche mit Homo- und Hetero-Transplantaten (Dura, Serosa vom Kalbsdarm, Pericard, Perichondrium vom Nasenseptum), die zum Teil auch befriedigende Resultate erzielten (BIRCH 1961, JANSEN 1963, TROMBETTA 1963).

Im allgemeinen Trend zur Homotransplantation wurden nun von einer Reihe von Ohrchirurgen Leichentransplantate des Trommelfells und der Gehörknöchelchen frisch und konserviert verwendet. Nach den ersten erfolgreichen Übertragungen glaubten einige Autoren (BRANDOW, CORNISH 1970), das Mittelohr sei aufgrund seines Hohlraumsystems mit geringer Ernährung und feinen Kontaktstellen der Gehörknöchelchen untereinander und zur Paukenhöhle ein für die Transplantation ebenso günstiger Ort wie die vordere Augenkammer. Immunologische Abwehrreaktionen wurden zwar diskutiert, jedoch nicht nachgewiesen (TIEDEMAN 1961, MAWSON 1970, PLESTER 1970).

B. I. Die Transplantation von homostatischem Stützgewebe

1. Die Transplantation von Knochen:

Ein Knochentransplantat soll nicht nur einen Defekt überbrücken, sondern auch aus eigener Kraft die Osteogenese im Transplantat oder das Wirtslager zur Osteogenese anregen, da das Transplantat letzten Endes in den Empfänger-Organismus integriert werden soll. Wir müssen nach den neuesten Erkenntnissen der Anatomie und Physiologie davon ausgehen, daß im Vordergrund des Umbaus die Leistung eines prae-terminierten osteogenetischen Keimgewebes steht. Seit langem wird darüber diskutiert, ob das Transplantat oder Teile des Transplantates überleben und von sich aus Knochen aufbauen, oder ob das Transplantat eine mehr oder weniger passive Rolle spielt und nur als Leitgerüst dem einsprossenden Lager-Bindegewebe dient oder das Einwachsen von Bindegewebe zu verhindern hat (SEIFFERT 1967, SCHWEIBERER 1970).

Das knöcherne Transplantat wird vollständig seiner vaskulären Versorgung durch die Entnahme aus seinem Lager beraubt. An frischen Schliffen aus Frakturzonen konnte nachgewiesen werden, daß die Osteozyten in der Wandung der HAVER'schen Kanäle noch 1 - 2 Wochen überleben können (SCHENK, WILLENEGGER 1964). Das Überleben seiner zellulären Elemente ist abhängig vom Lager und der von ihm ausgehenden Diffusion und Revaskularisation. Letzteres steht wiederum in engem Zusammenhang mit der Form bzw. Struktur des Transplantates, das umso leichter vom Lagergewebe erschlossen wird, je weitmaschiger sein Grundgerüst ist (MATTHI 1932, ABBOT 1947).

Bis heute ist noch ungeklärt, ob das Gefäßnetz das Transplantat überlebt und Anastomosen mit einsprossenden Kapillaren eingeht (CONWAY 1951, BURLAN 1955, 1958). Dies ist jedoch auch hier von nicht allzu grosser Bedeutung. Entscheidend bleibt, daß die Vaskularisation von Transplantaten im

Mittelohr relativ rasch erfolgt (6. - 8. Tag) und hierbei die Ernährung der Transplantatzellen (autogen, iso-allogen) gewährleistet ist. Die Ernährung eines Transplantates in den ersten 4 - 6 Tagen kann jedoch nur durch Diffusion geschehen. Diese Möglichkeit der Ernährung wurde mit Versuchen von Knochentransplantaten in Millipore-Diffusionskammern intraperitoneal verpflanzt - gesichert (ALGIRE, WEAVER, PREHN 1954, ROSIN und FREIBERG 1963, ECKE 1967). Die Überlebensfähigkeit der autogenen Knochenzellen auf Zeit ist somit erwiesen, sofern sie in geeignetes Milieu oder vaskularisationsfähiges Lager verpflanzt werden.

Die osteogenetische Leistungsfähigkeit des Periostes war von jeher Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Während das Periost des wachsenden Organismus reichlich Präosteoblasten und Osteoblasten in der Kambiumschicht enthält, bedarf das Periost beim erwachsenen Individuum zur Aufnahme seiner spezifischen Tätigkeit des von der absterbenden, ihm organisch verbundenen Knochen-Hartsubstanz ausgehenden Anreizes (AXHAUSEN G., 1908 /1928). Dadurch beginnen die sich vermehrenden osteoblastischen Zellen der Kambiumschicht, neuen Knochen an das überpflanzte nekrotische Gewebe anzulagern. Dies lässt sich einfach beweisen durch Transplantation periostfreier Corticalisspäne. Mit der Entfernung des Periostes entfällt die rasche und kräftige subperiostale Knochenneubildung, und der Abbau und Umbau des abgestorbenen Transplantatknochens wird erheblich verzögert. Im periostbedeckten, autogenen Span beginnt die Knochenneubildung regelmässig am 3. bis 4. Tag (AXHAUSEN G., 1909, KOCH 1924, AXHAUSEN W., 1962). An den periostlosen Spänen setzt die Knochenneubildung erst später und vor allem zuerst an der Markseite und an den Enden des Spanes ein,

wo die geöffneten HAVERS'schen Kanäle mit den Osteoblasten Anschluß an die Gefäßversorgung gefunden haben. Die Knochenneubildungsfähigkeit des Periostes bleibt aber von der Vaskularisierung abhängig (CHOEN, LACROIX 1955).

Die absterbende Knochengrundsubstanz übt einen spezifischen Reiz aus, der nach der Osteoblasten-Theorie auf unspez. osteoblastischen Zellen und nach der Induktions-Theorie auf die pluripotenten Mesenchymzellen des Lagergewebes wirkt. Werden aus einem spongiösen Knochen die anhängenden Weichgewebe ausgewaschen, ohne die Grundsubstanz chemisch zu verändern, so sinkt die osteogenetische Potenz erheblich ab und bleibt nur zu einem geringen Teil erhalten. Neuen Knochen bildet auch rotes Mark eines spongiösen Knochens, das für sich allein transplantiert wird. Seine osteogenetische Potenz ist aber vergleichsweise zum unveränderten autogenen Transplantat gering. Wird nun die zellfreie Knochengrundsubstanz mit dem roten Mark imprägniert, so steigt die osteogenetische Potenz ganz erheblich an. Sie erreicht somit Werte, die dem unveränderten autogenen Transplantat gleichkommen. Dabei ist offensichtlich gleichgültig, ob autogene oder allogene Knochengrundsubstanz verwendet wurde (BURWELL 1963/ 64). Die induktiven Substanzen treffen auf spezifische osteoblastische Zellen im Mark, wenn gleich auch reichlich im Mark vorhandene Retikulumzellen oder Endothelzellen sich zu Osteoblasten umwandeln dürfen (SCHWEIBERER 1970).

2. Die Transplantation von allogenem Bindegewebe - Übertragung von Trommelfellen.

Im Gegensatz zu den parenchymatösen Organen können allogen transplantierte Stützgewebe in vitalem oder devitalem Zustand unter gewissen Voraussetzungen funktionstüchtig

in einen Organismus einheilen. Autogene und allogene Transplantate bei der Abdeckung von Trommelfell-Perforationen, wie Mundschleimhaut (HALL 1958), Dura, Fascie, Pericard (TROMBETTA 1963), Peritoneum (BIRCH 1961), erfahren einen Umbau und Ersatz durch mehr oder weniger differenziertes Bindegewebe, wobei die Transplantate unter günstigen Bedingungen während des Substitutionsvorganges ihre mechanischen Aufgaben ohne Unterbrechung erfüllen können. Hierbei stellen die Transplantate eine Leitstruktur dar. Die funktionstüchtige Einheilung dieser Transplantate ist dabei nicht an die Vitalität der Gewebszellen gebunden. Die Beseitigung individualfremder Vorbehandlung und Konservierung kann unter bestimmten Bedingungen das praktische Ergebnis der Übertragung infolge einer Verminderung der immunologisch entzündlichen Reaktion sogar begünstigen. Unterschiede in der stofflichen Zusammensetzung und Struktur wie auch die Art und Dauer der Konservierung, bestimmen die biologische Wertigkeit der Transplantate, deren funktionelles Schicksal darüberhinaus in hohem Maße von den mechanischen Einflüssen am Einpflanzungsort abhängt (SEIFFERT 1967, 1970, KASTENBAUER 1972).

II. Eigene Untersuchungen

1. Problemstellung

Nachoperationen von Patienten, bei denen eine allogene Transplantation von Trommelfell und Gehörknöchelchen vorgenommen worden war, boten Hinweise für Transplantationsreaktionen. Trotz einer zunehmenden Zahl derartiger Transplantationen wurden immunologische Vorgänge nie nachgewiesen.

Neuerdings weiß man aus experimentellen Untersuchungen, daß allogene Transplantate von Gehörknöchelchen und Trommelfell im Tierexperiment Transplantationsreaktionen bewirken, die um so deutlicher auftreten, je entfernter der Verwandtschaftsgrad der Versuchstiere ist.

(KASTENBAUER 1972)

Neben den genannten histologisch nachweisbaren Transplantationsreaktionen suchte man nach humoralen Immunreaktionen, die allerdings im allogenen System nur schwer erfaßbar sind. Vermutlich ist die schwache Antigenizität dieser allogenen kollagenhaltigen Transplantate für die erwähnte verzögerte Immunreaktion verantwortlich. Mögliche Antigene werden wahrscheinlich erst allmählich im Laufe von Resorption und Ersatz des transplantateigenen Gewebes vom Wirtsorgan phagozytiert und als Antigen erkannt.

Ziel dieser Arbeit war es, durch die Immunisierung von Kaninchen mit hochmolekularem Material aus menschlichen Trommelfellen und Gehörknöchelchen Antiseren zu gewinnen und eine organspezifische Antigenizität der Mittelohrtransplantate nachzuweisen. Wir wählten zu dem Zweck ein xenogenes System (Mensch/Kaninchen), da sich im allogenen System serologisch nur schwer nachweisbare Immunreaktionen finden lassen. Dabei hofften wir besonders, auch schwache antigene Determinanten aufdecken

zu können, die möglicherweise für die schwer erfaßbare Immunreaktion im allogenen System verantwortlich sind.

2. Abkürzungen

GKE	: Gehörknöchelchenextrakt	} vom Menschen
Trfl.	: Trommelfelleextrakt	
PBS	: Gepufferte physiologische NaCl-Lösung	
Tris	: Tris (Hydroxymethyl) Aminomethan	
NKS	: Normales Kaninchenserum	

3. Die Transplantation von menschlichen Gehörknöchelchen auf das Kaninchen.

Die Einheilungsvorgänge am xenogenen Transplantat verlaufen völlig anders als beim allogenen. Massive Rundzellinfiltrate weisen auf eine sehr starke Abwehr-Reaktion gegen das artfremde Gewebe hin. Die Transplantat-Abwehr übertrifft bei weitem die Gewebe-Reaktion auf ein allogenes Material. Auch die Tiefkühlung und Cialit-Konservierung können die massive zelluläre Reaktion nicht mindern. Eine osteogenetische Phase im Transplantat bleibt aus, da die osteoinduktive Potenz der abgebauten Knochen-Grundsubstanz nur innerhalb einer Spezies wirksam ist (SCHWEIBERER 1970, KASTENBAUER 1972).

Entscheidend für die Immunabwehr ist der Grad der Histokompatibilität, die durch die individualspezifischen Eiweißstrukturen vor allem der Zelloberfläche bestimmt wird. (I. ROITT 1972). Bei verschiedenen Spezies fand man nun, daß eine Immunabwehr genetisch festgelegt ist, ja man hat sogar einen einzelnen Chromosomenabschnitt lokalisieren können, der den sogenannten Major Histocompatibility Complex (MHC) trägt. Die Gene dieser Chromosomenregion bestimmen die Transplantations-(Histokompatibilitäts-) Antigene, gegen die eine Immunantwort gerichtet ist (F.H. BACH 1976).

Die individualspezifische Eiweißstruktur bedingt, daß eine Immunabwehr auch innerhalb der gleichen Art zustande kommt. Nach der individual-unterschiedlichen Transplantation kommt es gesetzmässig zur Abstossung des Transplantates. Auf die allogene Knochen-Transplantation übertragen bedeutet das, daß vor allem die für die Osteogenese so wichtigen osteoblastischen Transplantatzellen absterben (SCHWEIBERER 1970)!

4. Die Transplantation von menschlichen Trommelfellen auf das Kaninchen.

Methode: Die Trommelfelltransplantate wurden menschlichen Leichen unter 24 Stunden post mortem unter keimarmen Verhältnissen entnommen. Unter dem Ohrmikroskop wurde die äußere Epithelschicht abpräpariert und der Hammerkopf im Collumbereich reseziert oder der Hammer ganz ausgelöst. Es entstand somit ein Transplantat aus Lamina propria mit oder ohne eingelagertem Hammergriff und dem einschittigem Epithel der Paukenschleimhaut an der Innenseite des Trommelfells. Um die trichterförmige Gestalt des Trommelfells zu erhalten, wurde der Annulus fibrosus in seiner ganzen Zirkumferenz erhalten. Die Transplantate wurden bis zur Übertragung entweder bei -17° C eingefroren oder in Cialit-Lösung konserviert.

Aufgrund seiner lockeren Faserstruktur wird das xenogene Trommelfell im Gegensatz zum xenogenen Gehörknöchelchentransplantat rasch nach 3-4 Monaten abgebaut und bindegewebig umgebaut.

Nach 3 bis 4 Monaten ist der Einbau weitgehend abgeschlossen. Daraus resultiert ein scheinbar funktionstüchtiges Ersatztrommelfell. Wird der Hammergriff mit übertragen, so verfällt er der Resorption. Diese Transplantate entwickeln im Kaninchen humorale Antikörper, wenn Material aus löslichen Proteinen von menschlichen Trommelfellen Kaninchen injiziert wird. Man unterscheidet hierbei zwei Antigentypen, die LD- und die SD-Antigene (LD= lymphocyte detectable, SD= serologic detectable), die in bestimmter Weise auf fremde antigene Determinanten eines Transplantates reagieren. Beide Antigentypen gehören zum HL-A-System (HL-A = Human Leucocyte-Antigen) welches das Gros der individual spezifischen Eiweißstrukturen repräsentiert(vide infra!). Theoretisch wird das meiste Interesse solchen Antigenen zuteil, die Transplantationsimmunität (LD-Antigene) hervorrufen können. Antigene,

die einen Anstieg humoraler Antikörper (SD-Antigene) verursachen, sind weit mehr untersucht, da in diesem Fall serologische Tests verwendet werden können. LD- und SD-Antigene sind nicht unbedingt unterschiedlich, und ihre Unterscheidung ist mehr funktioneller Natur. Grundsätzlich können Histokompatibilitätsantigene (z.B. bei allogenen Transplantaten) sowohl zelluläre Sensibilisierung als auch Bildung zirkulierender Antikörper hervorrufen. SD-Antigene werden allem Anschein gegen Glykoproteiden gebildet, die meist mit Lipoiden assoziiert, in den Zellwänden oder in zellinneren membranartigen Strukturen der Lymphozyten und auch allen anderen Geweben vorkommen. Sie ähneln hierbei den ABO-Blutgruppenantigenen des Menschen, die ebenfalls an Zelloberflächen lokalisiert sind und denen durch Aneinanderreihung von Zuckerresten immunologische Spezifitäten verliehen wird. Bei der allogenen Übertragung spielen diese SD-Antigene hinsichtlich der Sensibilisierung eine untergeordnete Rolle. Der entscheidende Abstossungsfaktor ist das LD-Antigen, das die zellvermittelte Immunantwort auslöst. Dieses LD-Antigen erzeugt Abwehrreaktionen, die primär an das lymphatische System des Empfängers gebunden sind (BURWELL 1961, BACH 1976). So läßt sich auch in vitro durch das Ausmaß einer Immunantwort von Lymphozyten auf fremde LD-Antigene (Vergrößerung, Blasten-Bildung, Teilung) der Grad einer Histocompatibilität messen (BACH 1976). Auch kann man Abwehrreaktionen gegen Hauttransplantate bei einem primär nicht sensibilisierten Empfänger wohl durch Lymphozyten nicht aber durch Serum von einem anderen sensibilisierten Tier übertragen. Die eigentliche Transplantatreaktion ist also die zelluläre (lymphozytäre) Reaktion, die von einer begleitenden humoralen Reaktion allenfalls unterstützt wird: Antikörper wirken als "Opsonine", fördern damit die Phagozytose der Antigene, wodurch wiederum der antigene Reiz intensiviert wird.

jedoch können uns die durch ein Transplantat hervorgerufenen Antikörper außerordentlich nützlich zum Nachweis von Art und Stärke der Histokompatibilitäts-Antigene eines Individuums sein. Aus Tierexperimenten mit Inzuchtstämmen von Mäusen weiß man, daß die individuelle Histokompatibilität genetisch festgelegt ist. In Hinblick auf Organtransplantationen hat man die Histokompatibilitätsantigene beim Menschen eingehend untersucht. Genetische Studien an Inzuchtstämmen sind hier natürlich nicht möglich: Man weiß aber, daß die Leukozyten-Antigene (HL-A) mit dem Histokompatibilitätsantigen gut korrelieren. Durch Testseren kann man bis jetzt mindestens 12 Leukozyten-Antigene unterscheiden, die bei einem Individuum repräsentativ für den Histiotypus angeordnet sind. Durch Auswahl eines Spender-Empfängerpaares mit nur wenigen Antigendifferenzen können wir die Transplantatreaktion möglichst gering halten. Grundsätzlich gilt auch für die Transplantation im Schallleitungsapparat, daß eine weitgehende Kongruenz der Histokompatibilitätsantigene entscheidend für die Einheilungstendenz ist. Vermutlich kommen aber bei diesen Transplantaten nur eine gewisse Auswahl und nicht sämtliche Histokompatibilitätsantigene zur Geltung. Während nach der allogenen Übertragung nur gelegentlich humorale Antikörper gefunden werden, steigen diese nach der xenogenen Transplantation regelmässig an (ALLGÖVER, BLOCKER, ENGLELY 1952, BURWELL 1963/64). Dieser humorale Antikörpernachweis gelang aus xenogenem Knochen (menschliche Gehörknöchelchen und Mastoide) als auch mit Homogenaten aus menschlichen Trommelfellen, wobei die immunogenen Faktoren sicherlich hauptsächlich mitübertragene Blutbestandteile des Menschen in den Transplantaten sind.

5. Biochemische Untersuchungen der menschlichen Gehörknöchelchen und Trommelfelle:

Die chemische Analyse für Knochen erwachsener Menschen ergibt folgende Werte: Wasser 20%, Kollagen 25% der Trockensubstanz, übrige Proteine 1,25%, anorganische Stoffe 65 bis 70%. Diese Werte wechseln jedoch im Laufe des Lebens, wobei mit zunehmendem Alter der Mineralgehalt und die Menge der organischen Substanzen steigt und der Wassergehalt aber sinkt (HOPPE, SEYLER, THIERFELDER 1962).

Die Stützsubstanzen im Körper (Bindegewebe, Knorpel, Knochen) zeichnen sich alle durch den Besitz reichlicher Interzellularsubstanzen mit der amöphen Grundsubstanz und den Fasern von kollagenen, retikulärem oder elastischem Charakter aus. Ungefähr 1/3 der gesamten Proteine des Körpers ist Kollagen. Chemisch gleichen sich die Kollagene - gleich welcher Herkunft - durch einen hohen Oxyprolin-, Prolin-, und Glykokollgehalt aus. Neuerdings wird dem Kollagen eine gewisse Antigenität zugeschrieben (STEFFEN, TIMPL 1964). Das Kollagen wird von den Fibroblasten gebildet und offenbar als Prokollagen an die Interzellularsubstanz abgegeben (WASSERMANN 1929 / 59). Der Stoffwechsel des Kollagens ist sehr viel langsamer als der von anderen Körperproteinen und fällt mit zunehmenden Alter weiter ab.

Wir führten an menschlichen Trommelfellen und Gehörknöchelchen mit und ohne Periost biochemische Analysen hinsichtlich ihrer Proteine und des Einflusses der Cialit-Lösung auf die Proteolyse durch. Dabei zeigte sich der typische kollagenartige Charakter der Ossicula und der Trommelfelle mit dem hohen Prolin- und Glycingehalt (KASTENBAUER 1973, HOCHSTRASSER 1973).

Methode: Die Gehörknöchelchen und Trommelfelle wurden entweder frisch oder Cialit-konserviert hydrolysiert und anschließend im BECKMANN-Unichrom-Analyzer untersucht. Die Hydrolyse erfolgte in 6-normaler HCl über 24 Stunden bei 105°C. Der Gehalt an Gesamtproteinen auf Prozent in Trockensubstanz beläuft sich auf 52,8 % und der frischen

Gehörknöchelchen auf 11,85 %. Davon entfallen bei den Gehörknöchelchen auf die unlöslichen Proteine 81,1 bis 86,4 % und auf die löslichen 13,6 bis 18,9 %. Nach der Konservierung in Cialit steigt der Prozentsatz der unlöslichen Proteine auf Werte zwischen 91,4 bis 96,8 % und der löslichen sinkt auf 3,2 bis 8,6 % ab.

Präparieren wir von den Gehörknöchelchen das Periost unter dem Mikroskop ab und untersuchen wir nun die Ossicula frisch und Cialit konserviert ohne Periost und das Periost gesondert, so sehen wir, daß sich durch die Cialitkonservierung der Prozentsatz der löslichen Proteine am periostlosen Ossiculum mit 1,6 bis 2,6 % kaum ändert, daß aber der Anteil dieser Proteine im Periost von 19,6 % im frischen Periost beim Cialit-konservierten auf einen Wert von unter 1 % absinkt.

Wir sehen somit, daß sich der denaturierende Einfluß des Cialit fast ausschließlich im Periost niederschlägt. Wahrscheinlich wird durch diese weitgehende Aufhebung der Proteolyse eine antigenvermindernde Wirkung der Transplantate, sicher aber eine Verzögerung der Antigenfreisetzung bewirkt (KASTENBAUER, HOCHSTRASSER 1973). Von den 52,8 % Gesamtproteinen im menschlichen Trommelfell entfallen beim frischen Trommelfell auf die unlöslichen Proteine 79,8 % und auf die löslichen Proteine 20,2 %. Nach der Cialitkonservierung steigt der Prozentsatz der unlöslichen Proteine auf 95,2 % und der der löslichen Proteine sinkt auf 4,8 % ab. (SEIFFERT 1970) reiht seine verschiedenen konservierten Transplantate nach dem Grade ihrer Antigenität wie folgt ein: Am stärksten antigen wirkt das frische Transplantat, dann das tiefgekühlte und lyophilisierte, und an letzter Stelle steht das cialitkonservierte Transplantat.

Hinsichtlich der biochemischen Zusammensetzung der menschlichen Gehörknöchelchen und der Trommelfelle sowie des Einflusses der Konservierung dieser Transplantat-Teile in Cialit-Lösung stellten wir biochemische Analysen an. Um die antigene Wirkung der menschlichen Gehörknöchelchen- und Trommelfell-Transplantate zu prüfen, wurden Kaninchen im xenogenen System mit Homogenaten dieser Substanzen immunisiert und zum Nachweis der Antikörperbildung serologische Untersuchungen vorgenommen.

Auf einige morphologische Besonderheiten der menschlichen Gehörknöchelchen sei hier kurz hingewiesen. Die Knorpelanteile der Ossicula (spez. des Hammergriffes) sind darauf zurückzuführen, daß die Gehörknöchelchen ursprünglich als Hyalinknorpel angelegt sind und zuerst eine perichondrale und dann eine enchondrale Verknöcherung mit der Bildung von zahlreichen gefäßhaltigen Markräumen zeigen (EBNER 1903). Der Knorpel im Innern wird zum größten Teil abgebaut, so daß später fast nur Knochen mit spärlichen Knorpel einschüssen vorhanden ist. Das Periost der Ossicula kann streckenweise in Perichondrium übergehen, unter dem dann Zonen von hyalinem Knorpel zu beobachten sind.

Die Angaben über das Lymphsystem des Mittelohres sind spärlich. Nach den Untersuchungen von RAUBER und MOST besteht im menschlichen Gehör ein kontinuierliches Lymphkapillarsystem, welches sich vom äusseren Gehörgang durch das Trommelfell in die Paukenhöhle, über die Tube bis zum Pharynx erstreckt und mit den regionären Lymphknoten in Verbindung steht. Das Lymphgefäßsystem des Trommelfells verläuft entlang des Hammergriffs und steht mit der Cutis des äusseren Gehörgangs und der Paukenschleimhaut in Verbindung (KOLMER 1927).

6. Experimenteller Teil:

Es sollte versucht werden, die antigenen Determinanten von menschlichen Gehörknöchelchen und Trommelfellen durch eine Antikörperreaktion im Serum von Versuchstieren zu erfassen. Zu diesem Zweck wurden je 3 Kaninchen mit Gehörknöchelchenextrakt bzw. Trommelfelleextrakt immunisiert. Nachdem man ausreichende Antikörpertiter erreicht hatte, wurden die Tiere entblutet. Nach der Absorption gegen Erythrozyten, Serum und Lebergewebe vom Menschen gerichtete Antikörper in den gewonnenen Antiseren sollte versucht werden, spezifische Antikörper gegen Gehörknöchelchenextrakt bzw. Trommelfelleextrakt in den absorbierten Antiseren nachzuweisen. Da ein beträchtlicher Anteil des Antigens Gehörknöchelchenextrakt bzw. Trommelfelleextrakt aus kollagenen Substanzen besteht, sollte auch untersucht werden, ob die gewonnenen Antiseren Antikörper gegen menschliches Kollagen enthalten.

Methode: Insgesamt wurden etwa 170 menschliche Felsenbeine verarbeitet, die innerhalb von 24 Stunden post mortem aus der Leiche entnommen wurden. Die Ossicula und Trommelfelle wurden unter keimarmen Verhältnissen unter dem Lichtmikroskop aus der Paukenhöhle entfernt und bei -17°C eingefroren, nachdem die Trommelfelle desepithelialisiert und mitsamt dem Annulus fibrosus aus dem Hammergriff herausgelöst waren. Ähnlich verfuhr man mit den Ambossen und Hammern.

Nach der Homogenisierung in gepufferter isotoner NaCl-Lösung (pH 7,8) mit dem Ultraturax wurde das Material zentrifugiert und der Überstand (lösliche Partikel)

gegen Leitungswasser dialysiert, wobei kleinere Peptide und Salze ausgeschwemmt wurden. Lösliches hochmolekulares Material mit einem Molekulargewicht über 10 000 blieb auf diese Weise erhalten. Danach erfolgte eine erneute Dialyse des gewonnenen Materials gegen Aqua dest., um restliche Verunreinigungen durch Salze zu beseitigen. Anschließend wurde das Material lyophilisiert, das Gewicht bestimmt und die einzelnen Injektionsmengen festgelegt.

Gewinnung von G K E

Gehörknöchelchen frisch 3,1 g

|
lyophilisiert

|
homogenisiert

|
lyophilisiert

|
Dialyse über 2 Tage

|
lyophilisiert (ergibt 1200 mg hochmolekulares Material)

Gewinnung von Trfl - Extrakt

|
Trommelfelle frisch 2,581 g

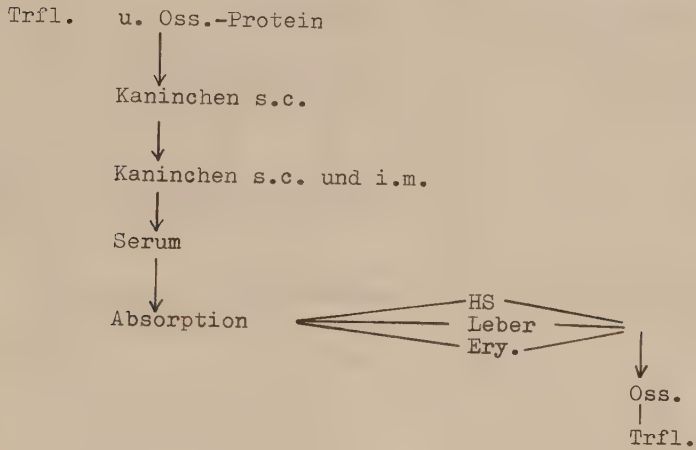
|
lyophilisiert

|
homogenisiert

|
Dialyse über 2 Tage

|
Lyophilisat (ergibt 600 mg hochmolekulares Material)

Ablauf des Experimentes:



6 A: Ablauf der Absorbition

Absorbition durch

Antiserum

1; Erythrocyten
Gruppe O

1 Stunde bei 20°C, dann
über Nacht bei 4°C

Hämaggl. ergibt noch schwache
Titer

2; Erythrocyten
Gruppe O

Absorbition vollständig
gegen Erythrocyten

3; 100 mg polymeris. HS
(Methode n. Avrameas)

1 Stunde bei 20°C, dann
über Nacht bei 4°C

Absorbition gegen HS vollständig

4; 250 mg Leberpuder

über 1 Stunde bei 20 °C

Absorbition gegen Gewebe-
antikörper vollständig!

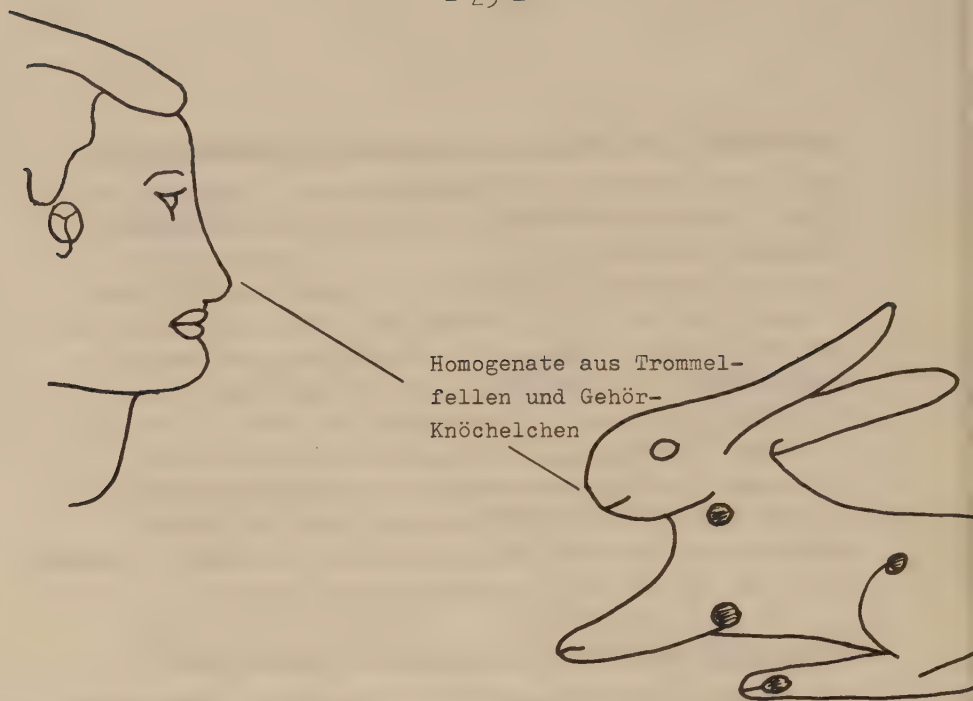
Hochmolekulares Material aus frischen Gehörknöchelchen:

Aus 3 x 172 menschlichen Gehörknöchelchen, Gesamtgewicht 9,894 g, wurden nach obiger Methode 62,2 mg lösliches Material gewonnen.

Jeweils 50 mg wurde in 12,5 ml 0,9 % NaCl-Lösung aufgeschwemmt und mit 0,5 ml Freundschem Adjuvans versetzt. Das gelöste Material wurde auf 20 Einzelinjektionen verteilt, so daß daraus eine Einzeldosis von 2,5 mg resultierte. Eine Einzeldosis von 2,5 mg Antigen war also in 0,075 ml 0,9 % NaCl und 0,025 ml Freundschem Adjuvans gelöst. Es wurden 3 x 50 mg zur Immunisierung von 3 Kaninchen verarbeitet. Der Rest des Materials wurde für spätere serologische Untersuchungen aufbewahrt. Das gesamte Material wurde bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

Hochmolekulares Material aus frischen Trommelfellen:

Aus 172 Felsenbeinen wurden 124 Trommelfelle (Gesamtgewicht 2,581 g) entnommen und nach der obigen Methode 1225,4 mg lösliches Material gewonnen. Jeweils 50 mg wurden in 1,5 ml 0,9 % NaCl-Lösung aufgeschwemmt und mit 0,5 ml Freundschem Adjuvans versetzt. Das gelöste Material wurde gleichfalls auf 20 Einzelinjektionen verteilt, so daß daraus eine Einzeldosis von 2,5 mg resultierte. Eine Einzeldosis von 2,5 mg Antigen war wiederum in 0,075 ml 0,9 % NaCl und 0,025 ml Freundschem Adjuvans gelöst. Es wurden wiederum 3 x 50 mg zur Immunisierung von 3 Kaninchen verarbeitet. Der Rest wurde für die spätere serologische Untersuchung als Antigen aufbewahrt und tiefgefroren.



Homogenate aus Trommelfellen und Gehörknöchelchen

2x 20 Injektionen, in
6 Wochen — Serologie

Versuchsschema zum Nachweis der antigenen Wirkung der injizierten Trommelfell- und Gehörknöchelchenhomogenate von Mensch auf Kaninchen

Technik der Immunisierung:

Es wurden je 3 Kaninchen mit Gehörknöchelchen- und Trommelfelleextrakt immunisiert. Die 20 Einzelinjektionen pro Kaninchen wurden wie folgt s u b c u t a n verabreicht:
(nach vorhergehender Rasur der entsprechenden Hautstellen)

Genick : 5 Injektionen

Axilla : 5 Injektionen

Inguinal : 5 Injektionen

Zwischen

Zehen : 5 Injektionen

Danach ließ man das Tier 30 Tage ruhen!

Anschließend erfolgte eine erneute Immunisierung subcutan nach obigem Schema, wobei wiederum jeweils 50 mg Material in 1,5 ml 0,9 % NaCl-Lösung aufgeschwemmt wurde und mit 0,5 ml Freundschem Adjuvans versetzt wurde. Bei dieser zweiten Immunisierung wurden jedoch statt 0,1 ml die doppelte Menge nämlich 0,2 ml Volumen subcutan injiziert. Außerdem erfolgte eine zusätzliche Injektion von jeweils 1,5 ml des wie üblich zubereiteten Material i n t r a m u s c u l ä r in den Musculus gastrocnemicus und dem Musculus triceps.

Ein Kontrolltier erhielt lediglich eine Emulsion aus Freundschem Adjuvans und 0,9 % NaCl-Lösung nach obigem Schema injiziert, um auszuschließen, daß die Versuchstiere allein schon gegen Freundsches Adjuvans humorale Antikörper bilden. Die verabreichte Menge betrug in diesem Fall pro Injektion subcutan 0,05 ml 0,9 % NaCl-Lösung und 0,05 ml Freundsches Adjuvans.

Zehn Tage nach der letzten Dosis wurden die Tiere in Nembutal-Narkose durch Punktion der Aorta abdominalis entblutet. Die gewonnenen Seren wurden bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren.

Außerdem wurden den Versuchstieren die regionalen Lymphdrüsen sowie Gewebe aus den Injektionsstellen zur histiologischen Untersuchung auf eine spezifische Immunreaktion entnommen.

Die Prüfung der gewonnenen Seren auf Antigen-Antikörper-Reaktion ergab erwartungsgemäß eine positive Reaktion. Im einzelnen fanden wir folgendes: (siehe auch Schema)

1. Eine deutliche Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen Gehörknöchelchenextrakt und Anti-Gehörknöchelchenextrakt-Serum fand erst bei 10 mg/ml Gehörknöchelchenextrakt statt. Das konnte bedeuten, daß nur ein sehr geringer spezifischer Titer von Anti-Gehörknöchelchenextrakt-Antikörpern gewonnen wurde.
2. Der Test mit Humanserum in verschiedenen Konzentrationen bot eine deutliche Reaktion in abgestufter Intensität bei allen Humanserum-Konzentrationen.
3. Die immunologische Prüfung mit menschlichen Leberextrakt zeigte ebenfalls eine deutliche Reaktion, außer bei 0,08 mg/ml.
4. Eine Prüfung auf irreguläre Antikörper [Ⓜ] blieb negativ. Es wurde dabei Gehörknöchelchenextrakt in der Konzentration von 10 mg/ml verwendet.

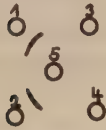
5. Der Test von Anti-Gehörknöchelchenextrakt-Antiserum auf Anti-Erythrozyten-Antikörper zeigte im Hämolyse-Test bei allen Reagenzgläsern, die jeweils 4 ml 0,5 % Erythrozyten-Suspension vom Menschen enthielten eine deutliche Hämolyse bei Zugabe von 1,6 ml Anti-Gehörknöchelchenextrakt-Antiserum.

✖ - (z.B. existierten irreg. Antikörper, wenn man wohl Präzipitation zwischen dem Antiserum und Gehörknöchelchenextrakt aber nicht zwischen Antiserum und Humanserum fände. In dem Fall besäße das Antiserum Antikörper gegen antigene Determinanten, die im Humanserum nicht vorkommen, z.B. Antikörper gegen kollagene Substanzen oder Mucopolysaccharide).

Die Untersuchung des Anti-Trommelfelleextrakt-Antiserums ergab identische Verhältnisse. Im Vortest der gewonnenen Seren prüften wir im OUCHTERLONY auf Reaktion zwischen dem Antiserum und Gehörknöchelchenextrakt bzw. Trommelfelleextrakt als Antigen. Dabei benutzten wir verschiedene Konzentrationen (10, 2, 0,4, 0,08 mg/ml) löslichen Antigens. Weiterhin prüften wir auf Reaktionen der Antiseren auf Humanserum, das vorher über 30 Minuten bei 56° C erhitzt wurde, um das Komplement zu inaktivieren. Wir verwendeten dabei Konzentrationen von 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 Humanserum. Darüberhinaus prüften wir unsere Antiseren auf Reaktionen gegen Leberextrakt, um unsere Antiseren auf Antikörper gegen menschliches Gewebe zu prüfen. Hierbei setzten wir Konzentrationen von 10, 2, 0,4, 0,08 mg/ml Stammlösung ein.

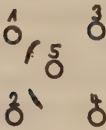
Vortest der Antiseren vom Kaninchen (schematisch dargestellt)

I. A. GKE



- | | | |
|----------------------------|---|------------------|
| 1 - 10 mg/ml | } | GKE - Antigenlg. |
| 2 - 2 mg/ml | | |
| 3 - 0,4 mg/ml | | |
| 4 - 0,08 mg/ml | | |
| 5 - Anti - GKE - Antiserum | | |

I. B. Trf.



- | | | |
|----------------------------|---|-----------------|
| 1 - 10 mg/ml | } | Trf- Antigenlg. |
| 2 - 2 mg/ml | | |
| 3 - 0,4 mg/ml | | |
| 4 - 0,08 mg/ml | | |
| 5 - Anti - Trf - Antiserum | | |

II. A. Humanserum



- | | | |
|----------------------------|---|---|
| 1 - 1 : 4 | } | Humanserum
(30 Min. bei 56°
zur Inaktivierung
v. Komplement) |
| 2 - 1 : 8 | | |
| 3 - 1 : 16 | | |
| 4 - 1 : 32 | | |
| 5 - Anti - GKE - Antiserum | | |

II. B. Humanserum



- | | | |
|----------------------------|---|--|
| 1 - 1 : 4 | } | Humanserum
(30 Min. bei 56°
z. Inaktivierung v.
Komplement) |
| 2 - 1 : 8 | | |
| 3 - 1 : 16 | | |
| 4 - 1 : 32 | | |
| 5 - Anti - Trf - Antiserum | | |

III. A. Leberextrakt



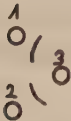
- | | | |
|-----|------------------------|----------------|
| 1 - | 10 mg/ml | } Leberextrakt |
| 2 - | 2 mg/ml | |
| 3 - | 0,4 mg/ml | |
| 4 - | 0,08 mg/ml | |
| 5 - | Anti - GKS - Antiserum | |

III. B. Leberextrakt



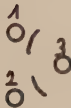
- | | | |
|-----|------------------------|----------------|
| 1 - | 10 mg/ml | } Leberextrakt |
| 2 - | 2 mg/ml | |
| 3 - | 0,4 mg/ml | |
| 4 - | 0,08 mg/ml | |
| 5 - | Anti - Trf - Antiserum | |

IV. A. Test auf irreguläre Antikörper, z.B. Anti-Kollagen-AK



- | | |
|-----|--------------------|
| 1 - | GKE 10 mg/ml |
| 2 - | HS 1 : 16 |
| 3 - | Anti-GKS-Antiserum |

IV. B. Test auf irreguläre Antikörper, z.B. Anti-Kollagen -AK



- | | |
|-----|---------------------|
| 1 - | Trf 10 mg/ml |
| 2 - | HS 1:16 |
| 3 - | Anti- Trf-Antiserum |

V. A. Hämagglutinationstest des Anti-GKE-Antiserums vom
Kaninchen auf Anti-Erythrocyten-Antikörper

O 0,2 ml Antiserum	}	und jeweils 0,05 ml Puffer sowie 4 ml 0,5 % Ery- throcytensuspension
O 0,4 ml Antiserum		
O 0,8 ml Antiserum		
O 1,6 ml Antiserum		

V. B. Hämagglutinationstest des Anti-Trfl.-Antiserums vom
Kaninchen auf Anti-Erythrocyten-Antikörper

O 0,2 ml Antiserum	}	und jeweils 0,05 ml Puffer sowie 4 ml 0,5 % Ery- throcytensuspension
O 0,4 ml Antiserum		
O 0,8 ml Antiserum		
O 1,6 ml Antiserum		

Nachdem die Vorteste gezeigt hatten, daß die immunisierten Kaninchen ausreichende Titer von Antikörpern gegen menschliches Gewebe, Humanserum und Erythrozyten gebildet hatten, erfolgte als nächste Phase unserer experimentellen Untersuchung die Absorption unserer gewonnenen Antiseren. Dabei sollte versucht werden, spezifische Antikörper gegen Gehörknöchelchen bzw. Trommelfell nachzuweisen, um damit organspezifische Antigene der Gehörknöchelchen bzw. Trommelfelle festzustellen. Bekanntlich werden bei der Immunisierung mit Gehörknöchelchen- bzw. Trommelfellextrakt eine Vielzahl von unterschiedlich starken Immunogenen übertragen, was sich in dem gewonnenen Antiserum als Gemisch von Titern z.B. gegen Blutgruppenantigene oder gegen HL-A (human leukocyte antigen) zeigte. (Die meisten gewebsspezifischen Antigene eines Individuums befinden sich auf der Leukozytenmembran, weshalb Leukozyten auch zur Charakterisierung des Histiotypus eines Individuums verwandt werden).

Diese Vielfalt von Immunogenen birgt insofern eine Quelle von Störfaktoren in sich, als nach den Gesetzen der Immunologie ein starkes Immunogen die Identifizierung von schwachen Immunogenen behindern kann (Immune Deviation). Oder aber eine Sensibilisierung von "Vorläufer-Lymphozyten" bleibt wegen gebildeter Antigen-Antikörper-Komplexen aus (Enhancement). Inwieweit sog. blockierende Antikörper Toleranz gegen fremde Immunogene erzeugen, ist noch nicht geklärt (R. BILLINGHAM 1975).

Eingangs hatten wir ja bereits erwähnt, daß ca. 1/3 sämtlicher Proteine des Körpers aus Kollagen bestehen. Wenn die kollagenen Fasern vorerst auch unlöslich sind, natives Kollagen besitzt eine Tripelhelix-Struktur mit einem MG von 290 000 und ist z.B. in den Ossicula in Interzellularsubstanzen wie Knochen oder Knorpel eingebettet, so kann es durch Makrophagen phagozytiert werden und mittels Opsonin zu einer Immunantwort führen.

Allerdings ist aus Arbeiten von TIMPL et al. (1969) bekannt,

daß Kollagen nur eine sehr schwache Immunogenität besitzt. Im Vergleich wirkt Humanserum 100fach stärker antigen.

Um den besonderen Charakter des Antigens Kollagen hervorzuheben, sei auf dessen Struktur kurz verwiesen:

Bekanntlich entsteht die Tripelhelix-Struktur durch H-Brücken-Vernetzung von 3 Polypeptidketten, die einen hohen Gehalt von Aminosäuren aufweisen, wobei jede 3. Position mit Glycin besetzt ist. Durch die Eigenheit der Tripelhelix-Struktur entsteht ein starres Stäbchen an dessen Enden jedoch kurze n i c h t helikale Sequenzen bestehen. Es ist aus Arbeiten von BECKER (1973) bekannt, daß eine Immunantwort auf das Antigen Kollagen hauptsächlich auf diese terminalen n i c h t helikalen Strukturen erfolgt, die übrigens die markantesten Speziesvariationen aufweisen.

Da eine Immunantwort auf antigene Determinanten des Kollagens nicht ausgeschlossen ist, haben wir versucht, aus frischen Trommelfellen Kollagen zu isolieren, um dann im OUCHTERLONY-Test Antikörper in unserem Anti-Trommelfell-extrakt-Antiserum nachzuweisen.

Gewinnung von löslichem Kollagen aus frischen Trommelfellen:

Das Ausgangsgewicht der frischen Trommelfelle betrug 3,1 g. Die Extraktion des löslichen Kollagens wurde wie folgt vorgenommen:

Das Material wurde mit 0,9 % NaCl aufgeschwemmt und über Nacht lyophilisiert. Danach erfolgte das Zerkleinern dieses Lyophilisats mit dem Ultraturax und anschließend mit dem Mörser. Nun wurde das Substrat erneut mit 0,9 % NaCl aufgeschwemmt und über 2 Tage lyophilisiert.

Das gewonnene Material wurde über 1 Stunde mit 1m NaCl und 0,05 m Trispuffer bei pH 7 gewaschen.

Anschließend wurde zentrifugiert und der Extrakt über 24 Stunden mit 0,5 % Essigsäure versetzt.

Danach wurde das gelöste Material über 24 Stunden bei 4°C auf 20 % KCl gebracht und anschließend zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 % Essigsäure über 20 Stunden bei 4°C gelöst. Darauf erfolgte eine Dialyse gegen 1% Essigsäure.

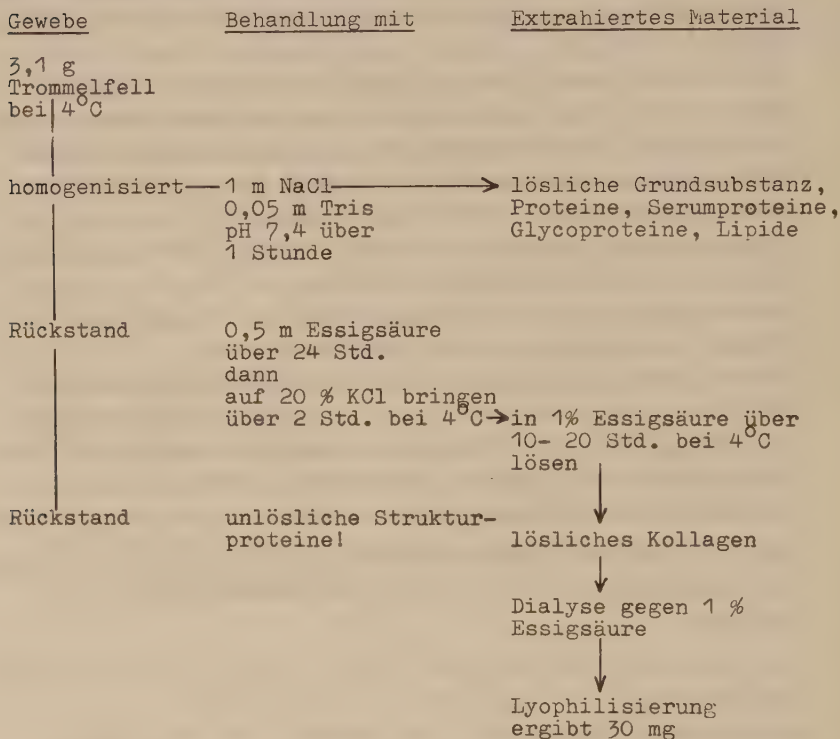
Das anschließend lyophilisierte Material ergab 30 mg Substanz.

(Diese Versuchsanordnung folgte einem Vorschlag von Dr. Becker, Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in München.)

Ein erneutes Lösen des Lyophilisats erfolgte in 10 ml 0,05 m Essigsäure und einigen gutt. PBS-Puffer (pH 7).

Anschließend führten wir einen OUCHTERLONY-Test unserer Antiseren auf etwaige Reaktionen mit dem wie oben erwähnt gewonnenen Kollagen durch: Es ließen sich hierbei weder beim absorbierten noch dem nicht absorbierten Antiserum eine Präzipitation feststellen, so daß eine Immunantwort auf antigene Determinanten des Kollagens in den injizierten Trommelfelleextrakt nicht nachweisbar war. Denkbar ist, daß durch Immunparalyse wegen der zu schwachen Antigenität des injizierten Kollagens oder durch Enhancement wegen der überstarken Antwort auf die antigenen Determinanten der Erythrocyten und des Humanserums eine Immunantwort auf Kollagen ausblieb.

STANDARDMETHODE ZUR ISOLIERUNG VON KOLLAGEN AUS TROMMELFELL:



Zur weiteren Untersuchung der gewonnenen Antiseren auf spezifische Antikörper, folgte jetzt die Absorbtion der Antikörper gegen Serumproteine, Erythrocyten und die Absorbtion der unspezifischen Antikörper.

Zunächst die Absorbtion des Antiserums (Gehörknöchelchen-extrakt / Trommelfelleextrakt) mit Erythrocyten vom Menschen:

1. Erhitzen der Antiseren über 30 Min. bei 56°C zur Inaktivierung des Komplements.
2. Langsames Drehen eines Volumens konzentrierter Erythrocyten und drei Volumina Antiserum über eine Stunde bei 20°C und Mischung über Nacht bei 4°C
3. Zentrifugieren des Gemisches und Testung des Überstandes auf hämagglutinierende Antikörper.

Es wurden zunächst 20 ml Blut der Gruppe O vom Menschen bei 3000 U/min. zentrifugiert und das Sediment unter erneuter Zentrifugation mit phys. NaCl-Lösung solange gewaschen, bis der Überstand farblos war. Nachdem wir auf diese Weise die Erythrocyten isoliert hatten, gab man zu 2 ml des Erythrocyten-Konzentrates 5 ml des inaktivierten Antiserums und vermischte beides wie beschrieben über eine Stunde bei 20°C und ließ das Gemisch anschließend über Nacht bei 4°C im Rotor drehen.

Danach erfolgte als nächster Schritt die Prüfung des absorbierten Antiserums auf hämagglutinierende Antikörper.

Zunächst zentrifugierte man das im Rotor belassene Erythrocyten-Antiserum-Gemisch vorsichtig bei 1200 U/Min. Im nun folgenden Hämagglutinationstest mit dem "Takatsy-Besteck" benutzte man als "Reaktionsmilieu" ein Gemisch

einer phosphatgepufferten isotonischen Kochsalzlösung a 199 Teilen und inakt. Humanserums a 1 Teil. Den Puffer, der einen pH-Bereich von 6,8 - 7,4 hatte, erhielten wir, indem wir 160 g NaCl und 31 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4(\text{H}_2\text{O})_2$ mit 20 Litern H_2O vermengten.

Ein Tropfen dieses physiologischen "Reaktionsmilieus" wurde im Hämagglutinationsansatz vorgelegt. Dann füllten wir als zu prüfende Substanzen je einen Tropfen Anti-Gehörknöchelchenextrakt-Antiserum bzw. Anti-Trommelfell-extrakt-Antiserum im doppelten Ansatz, der dann mittels des "Takatsy-Besteckes" fortlaufend verdünnt wurde. Im gleichen Hämagglutinationsansatz wurden auch normales Kaninchenserum (NKS) sowie der Puffer (PBS) allein ohne Antiserum auf etwaige Kreuzreaktionen getestet.

Nun füllten wir unseren Hämagglutinationsansatz mit 0,5 % Erythrocyten-Suspension, dem Indikator etwaiger Antikörper gegen Erythrocyten. Wir fanden sowohl bei der Verdünnungsreihe des Anti-Gehörknöchelchenextrakt-Antiserums als auch des Anti-Trommelfelleextrakt-Antiserums noch Titer von 1:4 .

Nachweis von Anti-Erythrozyten-Antikörpern in den Antisera von Kaninchen durch Hämagglutinationstest

1. Antiserum vor Absorption

PBS	NKS	T	T	PBS	NKS	0	0	
•	•	•		•	•	•	•	A
•	•			•	•	•	•	B
•	•			•	•	•	•	C
•	•			•	•	•	•	D
•	•			•	•	•	•	E
•	•			•	•	•	•	F
•	•			•	•	•	•	G
•	•			•	•	•	•	H
•	•			•	•	•	•	I
•	•			•	•	•	•	J
•	•			•	•	•	•	K
•	•			•	•	•	•	L
8	7	6	5	4	3	2	1	

Es findet sich wie erwartet eine Hämagglutination auch bei großer Verdünnung: Bei den beiden Seren ein Titer von 1 : 128

z.B. Reihe 6 zeigt: Die vollständigen Punkte bedeuten bei der obigen Fotokopie fehlende Hämagglutination, während die hämagglutinierten Erythrozyten suspendiert bleiben.

z.B. Reihe 1, 2 und 5 zeigen Hämagglutination bis Nr. G, das bedeutet ein Hämagglutinationstiter von 128 .

2. Antiseren n a c h Absorbtion der Antiseren:

PBS	NKS	T	T	PBS	NKS	O	O	
.	.			.	.			A
.	.			.	.			B
.	.			.	.			C
.	.		.	.	.	.	.	D
.	.	.	.	.	.	.	.	E
.	.	.	.	.	.	.	.	F
.	.	.	.	.	.	.	.	G
.	.	.	.	.	.	.	.	H
.	.	.	.	.	.	.	.	I
.	.	.	.	.	.	.	.	J
.	.	.	.	.	.	.	.	K
.	.	.	.	.	.	.	.	L
8	7	6	5	4	3	2	1	

Es findet sich eine Hämagglutination bei 1, 2, 5 und 6 in Reihe A - C . Der Titer beträgt noch 1 : 4 beim Anti-Gehörknöchelchenextrakt-Antiserum, bzw. 1 : 4 beim Anti-Trommelfelleextrakt-Antiserum. Die fehlenden bzw. mangelnden Punkte in obiger Darstellung bedeuten wiederum hämagglutinierende d.h. suspendierte Erythrozyten.

Die Absorbtion der Antiseren gegen Erythrozyten wird wiederholt.

3. Antiseren nach w i e d e r h o l t e r Absorbktion
der Antiseren:

<u>PBS</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>O</u>	<u>O</u>	
.					A
.					B
.			.	.	C
.	.	.	.	.	D
.	.	.	.	.	E
.	.	.	.	.	F
.	.	.	.	.	G
.	.	.	.	.	H
.	.	.	.	.	J
.	.	.	.	.	J
.	.	.	.	.	K
.	.	.	.	.	L
5	4	3	2	1	

Trotz wiederholter Absorbktion noch Hämagglutination bei beiden Antiseren. Der Titer beträgt 1:4 beim Anti-Gehörknöchelchenextrakt-Antiserum, bzw. 1:8 beim Anti-Trommelfelleextrakt-Antiserum. Fehlende Punkte bedeuten wiederum hämagglutininierende d.h. suspendierte Erythrozyten.

Wir vermuteten, daß die Absorbktion gegen Erythrozyten ungenügend war und veranstalteten eine nochmalige Absorbktion unserer Antiseren in gewohnter Weise. Der am folgenden Tag unternommene erneute Hämagglutinationstest bot dieses Mal jedoch für das Anti-Gehörknöchelchenextrakt-Antiserum einen Hämagglutinationstiter von 4, beim Anti-Trommelfelleextrakt-Antiserum betrug der Titer 8. Trotz wiederholter Absorbktion unserer Antiseren konnte der Hämagglutinationstiter also nicht auf 0 erniedrigt werden: Wir vermuteten, daß durch sedimentieren nach dem Absorbktionsvorgang Antikörper gegen Erythrozyten wieder in Lösung gehen. Mithin läßt sich ein Resttiter von Antikörpern mit unseren Methoden nicht vermeiden, jedoch erscheint die restliche Hämolyseaktivität unserer Antiseren gering im Vergleich zum Hämagglutinationstiter v o r Absorbktion, der ja 128 betrug.

Zur weiteren Absorbktion der in unseren Antiseren vorhandenen Antikörper gegen Humanserumproteine erfolgte eine quantitative Absorbktion der Antiseren mit vernetztem unlöslichem Humanserum.

Weshalb unlösliches Humanserum als Antigen?

Die kausale Idee weshalb es wünschenswert ist, das Antigen oder besser das Immunadsorbens in eine unlösliche Form zu überführen, bildet das Dissoziationsverhalten der Antigen-Antikörper-Komplexe. Bekanntlich unterliegt auch die Bildung von Antigen-Antikörper-Reaktionen einem Äquivalenzgesetz, wobei jedes verschiedene Protein nach der "Heidelberger Kurve" einen verschiedenen Äquivalenzpunkt besitzt. Es erscheint also äußerst schwierig, durch ein lösliches antigen,

in unserem Falle Humanserum, das Dissoziationsbestreben der Immunkomplexe zu verhindern und sämtliche Antikörper aus einem Gemisch zu isolieren.

Eine wirksame Methode mit der man Antikörper ohne Kenntnis ihres Äquivalenzverhaltens spezifisch und quantitativ aus einem Gemisch isolieren kann, stellt die Vernetzungsmethode nach AVRAMEAS et al., (Immunochemistry, Vol. 6, 1969, S. 53) dar.

Nach dieser Methode gewinnt man durch gleichnamige Vernetzung von Proteinen mit Glutaraldehyd ein unlösliches und stabiles Immunabsorbens, mit dem sich spezifische Antikörper aus einer Lösung beseitigen lassen. Ein auf solche Weise hergestelltes Immunabsorbens verhält sich sogar unlöslich gegenüber Harnstoff oder Natrium-Dodecylsulfat, und ist unabhängig vom pH-Wert des Reaktionsgemisches. Die Absorptionskapazität von 50 mg unlöslichem IgG beträgt fast 50 mg des entsprechenden Antikörpers, während z.B. unlösliches Bence-Jones-Protein nur 10 mg absorbierten Antikörpers aufweisen können.

Unlösliches Humanserum vermag nahezu alle Antikörper aus entsprechenden Antiseren vom Kaninchen absorbieren (Zit. aus der Arbeit von Avrameas). Nach den Angaben des o.a. Originals fertigten wir unser unlösliches Immunabsorbens an. Sämtliche Versuchsschritte wurden in einer "Kühlkette" vorgenommen.

Herstellung eines unlöslichen Immunabsorbens:

Es wurden 5 ml Humanserum gegen einen 0,2 m CH_3COOH - Puffer über Nacht dialysiert bei einem pH von 5 und das Puffervolumen von 200 ml während der Zeit dreimal gewechselt. Außerdem unternahm man zur Proteinbestimmung eine Biuret-Probe an dem verwendeten Serum und prüfte die Extinktion: Demnach enthielt unser Serum 5,75 % Protein, wonach 5 ml 287,5 mg Protein enthielten.

Im nächsten Versuchsschritt wurden 1,5 ml einer 2,5-%igen wässrigen Glutaraldehyd-Lösung zu den o.a. dialysierten 5 ml Humanserum gerührt. Es wurde über 20 Minuten gerührt, danach ließ man das Reaktionsgemisch über 3 Stunden lang stehen. Anschließend wurde das dispergierte unlösliche Material mit gekühltem Aqua dest. gewaschen, um gelöstes nicht vernetztes Glutaraldehyd zu entfernen. Nach 6maligem Waschen (eine Acetaldehyd-Probe des Überstandes verlief jedes Mal negativ), erfolgte die Extinktionsmessung des letzten Überstandes, um etwaige nicht gelöste Proteine zu erfassen: In unserem Überstand zeigte sich noch ein Extinktionswert von 0,16 entsprechend einem Proteingehalt von 116 gamma/ml. Wir wiederholten deshalb die 6malige Waschung, erhielten jedoch in unseren Extinktionsmessungen erneut Hinweise auf gelöstes Protein. Eine anschließende erneute 6malige Waschung zeigte wiederum Spuren von Protein bei der Extinktionsmessung, die gegenüber dem letzten Ergebnis noch erhöht waren. Wir deuteten die erhöhte Extinktion im Überstand unseres vernetzten Gels als Verunreinigung durch nicht polymerisiertes Glutaraldehyd. Um diese Verunreinigung zu beseitigen, wurde das polymerisierte Glutaraldehyd noch einmal in Aqua dest. gewaschen, der Überstand

wurde dieses Mal mit einer Sartorius-Membranfilter-spritze, Porengröße 0,2 gamma gefiltert und von dem Filtrat die Extinktion bestimmt. Dieses Mal erreichten wir bei unserer Extinktionsmessung einen Wert unter 0,3 gamma und hatten somit eine ausreichende Reinigung des mit Humanserum polymerisierten Glutaraldehyds von löslichen Proteinen erreicht.

Nun erfolgte als nächster Schritt die quantitative Absorbtion von Anti-Humanserum-Antikörpern mit dem unlöslichen Absorbens:

Das Glutaraldehyd-Polymerisat wurde in 2 Portionen entsprechend je 100 mg polymerisiertem Humanserum aufgeteilt. Eine Portion mischten wir mit 5 ml des Anti-Gehörknöchelchenextrakt-Antiserum, die andere Portion mit 5 ml Anti-Trommelfelleextrakt-Antiserum. Danach unternahmen wir die Resuspension bei 4°C über Nacht. Der absorbtionsvorgang gegen Anti-Humanserum-Antikörper wurde nun als abgeschlossen betrachtet und das Absorbens bei 3000 U/Min. abzentrifugiert. Der Überstand (unser absorbiertes Antiserum) wurde im OUCHTERLONY-Test gegen Humanserum als Antigen auf etwaige Anti-Humanserum-Antikörper getestet. Das Antigen Humanserum wurde hierbei in Konzentrationen von 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 benutzt. Bei keiner der genannten Konzentrationen des Antigens zeigten sich Präzipitate gegen unsere absorbierten Antiseren. Bei einem Vergleichstest, in dem das nicht absorbierte antiserum geprüft wurde, zeigten sich dagegen deutliche Präzipitationslinien bei allen Konzentrationen. Somit war unsere Absorbtion der Anti-Humanserum-Antikörper in den gewonnenen Antiseren erfolgreich und vollständig.

Wir unternahmen nun den nächsten Schritt in der Aufbereitung unserer Antiseren, die Absorption unspezifischer Gewebe-Antikörper durch menschliche Leber.

Zu dem Zweck stellten wir aus 5 g frischer Leber nach folgendem Schema ein Leberpuder her:

1. Die Leber wurde in kleine Stücke zerschnitten und in Aqua dest. gewaschen.
2. Vierfache Menge Aceton unter Rühren zu der zerkleinerten Leber gefügt.
3. Danach ließ man die Mischung sedimentieren und verwarf den Überstand.
4. Jetzt fügte man unter Rühren ein gleiches Volumen Aceton zu dem Sediment.
5. Nun zentrifugierte man die Gewebesuspension für 20 Min. bei 0°C und 2200 U/Min.
6. Der Überstand wurde wieder sorgfältig dekantiert und das verbliebene Gewebe in vierfacher Menge 0,9 % NaCl gewaschen.
7. Anschließend zentrifugierte man die Suspension erneut für 20 Min. bei 0°C und 2200 U/Min.
8. Jetzt wurde das Gewebe viermal in 0,9% NaCl gewaschen und zentrifugiert bis der Überstand farblos war.
9. Nach der letzten Sedimentation suspendierte man das Gewebe in einem vierfachen Volumen Aceton und
10. trocknete das Gewebe auf Filterpapier
11. Jetzt wurde das Material homogenisiert und über 2 Tage bei 37⁰ trockener Wärme inkubiert.

Auf diese Weise erhielten wir aus 5 g frischer Leber 1250 mg Leberpuder. Je 250 mg unseres Leberpuders mischten wir mit den 5 ml Antiserum gegen Gehörknöchelchenextrakt bzw. Trommelfelleextrakt, das ja bereits von Antikörpern gegen Erythrozyten und Humanserum gereinigt war. Die Mischung wurde für 1 Stunde bei 20°C im Rotor suspendiert

und dann bei 3000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand entsprach dem absorbierten Antiserum und wurde (zur Vollständigkeit der Absorption) im OUCHTERLONY auf etwaige Reaktionen mit Leber als Antigen getestet.

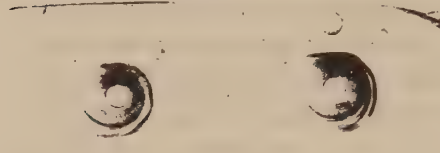
Wir stellten dazu ein Extrakt aus frischer Leber her: 5g frische menschliche Leber wurden mit dem Ultraturax homogenisiert unter Zusatz von doppeltem Volumen kalter 0,9 % NaCl. Anschließend wurde über 30 Min. bei 10 000 U/Min. zentrifugiert.

Der Überstand wurde in 2 Portionen geteilt:

Ein Teil wurde über 30 Min. bei 60°C inaktiviert (um unspezifische enzymatische Präzipitate zu verhindern) der andere Teil wurde so belassen.

Bei dem erhitzten Extrakt zeigte sich jedoch eine wahrscheinlich auf Eiweißfällung beruhende Trübung: Es wurde noch einmal über 15 Min. bei 3 000 U/Min. sedimentiert. Danach prüfte man beide Extrakte im OUCHTERLONY auf etwaige Präzipitate mit den absorbierten Antiseren. Auch die n i c h t absorbierten wurden geprüft.

u) Reaktionen der Antiseren v o r Absorbtion im
OUCHTERLONY



1:128 0 0:2
1:64 0 — 0:4 — ANTISERUM
1:32 0 0:8
1:16

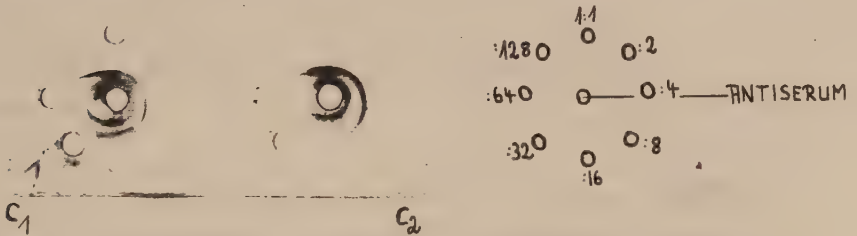
<u>Nr</u>	<u>Antiserum</u>	<u>Antigen</u>	<u>Reaktion im OUCHTERLONY</u>
A ₁	GKE	HS	3 Präzip. Linien 1: 64 1 Präzip. Linie 1: 256
A ₂	Trfl.	HS	2 Präzip. Linien 1: 16 2 Präzip. Linien 1: 256



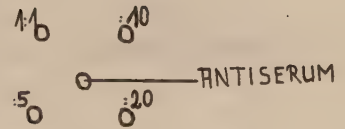
1:128 0 0:2
1:64 0 — 0:4 — ANTISERUM
1:32 0 0:8
1:16

<u>Nr</u>	<u>Antiserum</u>	<u>Antigen</u>	<u>Reaktion im OUCHTERLONY</u>
B ₁	GKE	LE n. inakt.	4 Präzip. Linien 1: 16 3 Präzip. Linien 1: 128
B ₂	Trfl.	LE n. inakt.	3 Präzip. Linien 1: 8 1 Präzip. Linie 1: 256

Reaktion der Antiseren v o r Absorbtion im OUCHTERLONY

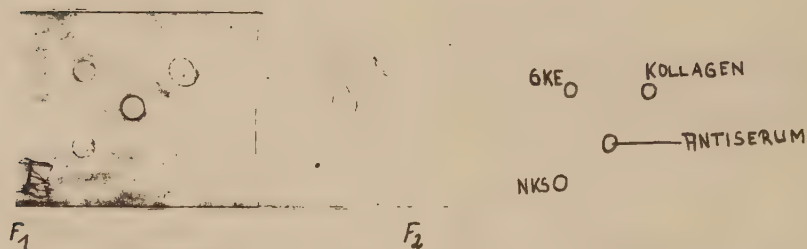
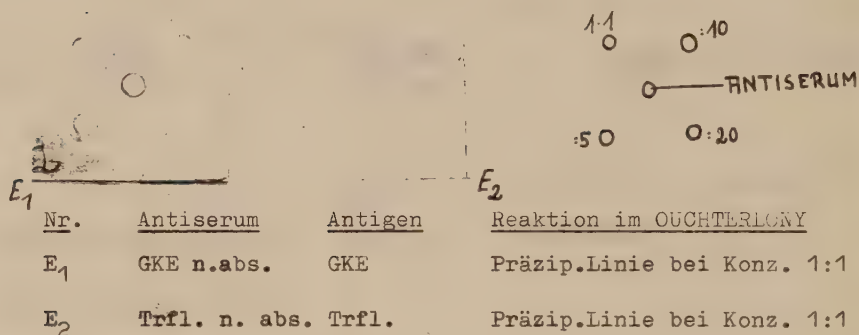


<u>Nr</u>	<u>Antiserum</u>	<u>Antigen</u>	<u>Reaktion im OUCHTERLONY</u>
C ₁	GKE	LE inakt.	3 Präzip.Linien 1: 32 1 Präzip.Linie 1:256
C ₂	Trfl.	LE inakt.	2 Präzip.Linien 1: 16



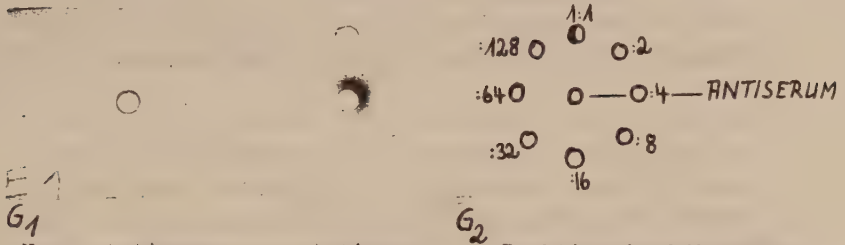
<u>Nr</u>	<u>Antiserum</u>	<u>Antigen</u>	<u>Reaktion im OUCHTERLONY</u>
D ₁	GKE n.abs.	Kollagen	keine Reaktion
D ₂	Trfl.n.abs.	Kollagen	keine Reaktion

Reaktionen der Antiseren v o r Absorbition im OUCHTERLONY

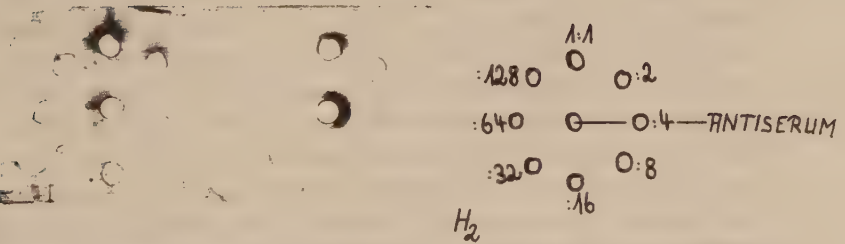


<u>Nr</u>	<u>Antiserum</u>	<u>Antigen</u>	<u>Reaktion im OUCHT RLONY</u>
F ₁	GKE n.abs.	GKE Trfl. Kol.	Reaktion mit Trfl.
F ₂	Trfl. n.abs.	GKE Trfl. Kol.	Reaktion mit Trfl.

Reaktionen der Antiseren n a c h Absorbition im
OUCHTERLONY



<u>Nr</u>	<u>Antiserum</u>	<u>Antigen</u>	<u>Reaktion im OUCHTERLONY</u>
G ₁	GKE abs.	HS	negativ
G ₂	Trfl.	HS	negativ



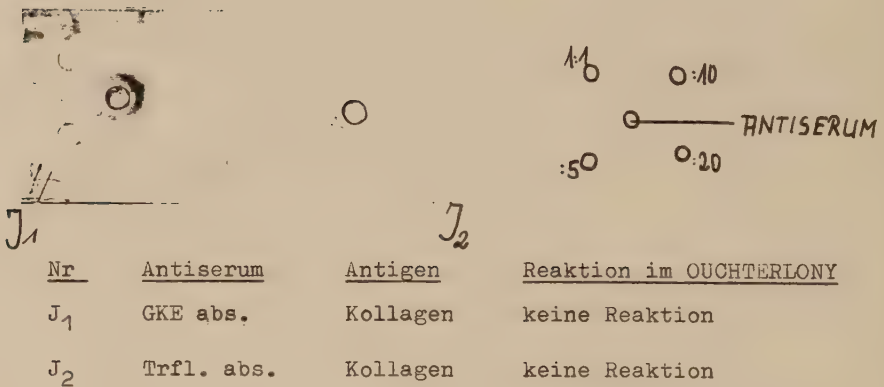
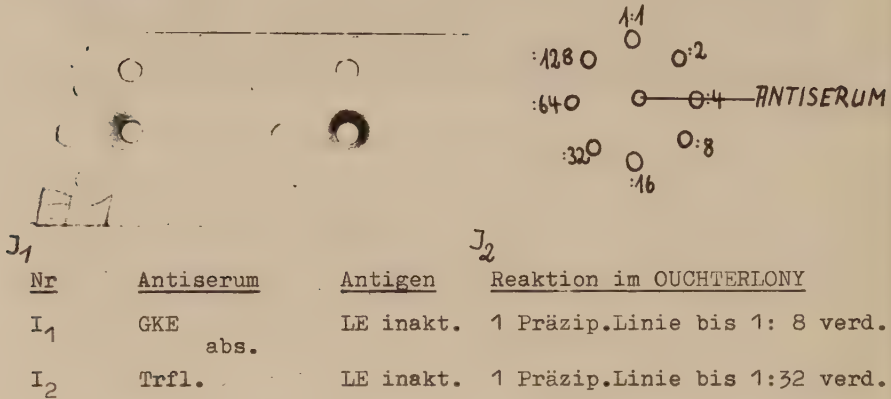
<u>Nr</u>	<u>Antiserum</u>	<u>Antigen</u>	<u>Reaktion im OUCHTERLONY</u>
H ₁	GKE abs.	LE n.inakt.	negativ
H ₂	Trfl.	LE n.inakt.	1 Präzip.Linie 1: 16 1 Präzip.Linie 1: 2

Beim Test der n i c h t absorbierten Antiseren auf Reaktionen mit Extrakt aus frischer menschlicher Leber fanden wir erwartungsgemäß deutliche Präzipitate mit dem inaktivierten und dem nicht inaktivierten Leberextrakt, wobei die Reaktion des letzteren Extraktes stärker ausfiel.

Nun der Präzipitationstest der a b s o r b i e r t e n Antiseren: Wir beobachteten bei Verwendung von nicht inaktiviertem Leberextrakt keine Reaktion beim absorbierten Anti-Gehörknöchelchenextrakt-Antiserum, während bei absorbierten Anti-Trommelfelleextrakt-Antiserum zwei Präzipitationslinien mit den Titern 16 bzw. 2 auftraten. Dieser Befund deutet auf eine Restaktivität des absorbierten Anti-Trommelfelleextrakt-Antiserums gegen menschliches Gewebe, die sich im Anti-Gehörknöchelchenextrakt-Antiserum nicht nachweisen läßt. Wir folgerten daraus, daß die Absorbition unserer Antiseren mit Leberpulver erfolgreich war. Die Restaktivität im Anti-Trommelfelleextrakt-Antiserum könnte einen Antikörpertiter gegen menschliche Trommelfelle darstellen, die ja wie eingangs erwähnt einen doppelt so hohen Prozentsatz an löslichen Proteinen besitzen, wie Gehörknöchelchen. Diese Restaktivität des Anti-Trommelfelleextrakt-Antiserums wollten wir in einem späteren Test gegen Trommelfelleextrakt als Antigen auf Spezifität prüfen: Sollte das absorbierte Anti-Trommelfelleextrakt-Antiserum mit Trommelfelleextrakt als Antigen Präzipitate bilden, so könnten wir annehmen, daß in dem absorbierten Anti-Trommelfelleextrakt-Antiserum noch spezifische Antikörper gegen Trommelfellgewebe enthalten ist. Beim parallel durchgeführten Test der absorbierten Antiseren mit inaktiviertem frischen Leberextrakt, boten sich dagegen einfache Präzipitationslinien mit beiden absorbierten Antiseren. Die zweifachen Präzipitations-

linien wie beim vorhergehenden Test mit Anti-Trommelfell-extrakt-Antiserum waren ausgeblieben: Wir vermuteten, daß durch die Erhitzung des frischen Leberextraktes bis 60° C eine Denaturierung eingetreten sein könnte, wodurch Kreuzreaktionen mit dem Antiserum entstehen können.

Reaktionen der Antiseren n a c h Absorbtion im
OUCHTERLONY



Reaktionen der Antiseren n a c h Absorbti on im
OUCHTERLONY

4:1 0 0:10
0 — NKS
:5 0 0:20

K₁

<u>Nr</u>	<u>Antiserum</u>	<u>Antigen</u>	<u>Reaktion im OUCHTERLONY</u>
K ₁	NKS	Kollagen	keine Reaktion

Nachweis der antigenen Wirkung von menschlichen Trommelfellen und Gehörknöchelchen im xenogenen System (Mensch - Kaninchen) im OUCHTERLONY - Test

35 mg eines nicht dialysierbaren löslichen hochmolekularen Materials aus einem Homogenat von nicht konservierten Trommelfellen und Gehörknöchelchen (42 Injekt. 40 Tagen bei 3 Tieren) ergaben mit komplettem Freundschem Adjuvans Antikörper vor Absorbition im OUCHTERLONY-Test folgende Resultate:

Dosis / Injektion : 0,5 mg, 1.0 mg

<u>Antigen</u>	<u>Anti-GKE-Antiserum</u>		<u>anti-Trfl.-Antis.</u>		<u>NKS</u>
Erythrozyten:	1:128		1:128		-
HS:	3 Titer	1: 64	2 Titer	1: 16	-
	1 Titer	1:256	2 Titer	1:256	-
Leber inakt.:	3 Titer	1: 32	2 Titer	1: 16	-
	1 Titer	1:256			
Leber nicht	4 Titer	1: 16	3 Titer	1: 8	-
inakt.:	3 Titer	1:128	1 Titer	1:256	-
Kollagen:	keine Reaktion		keine Reaktion		keine Reaktion
GKE:	1 Titer	1: 1			
Trfl.			1 Titer	1: 1	keine Reaktion

Das obige Schema gibt die in den vorangehenden OUCHTERLONY-Tests gefundenen Reaktionen der eingesetzten Antigene und Antisera wieder.

Die Antiseren wurden v o r Absorbition mit Humanserum, Leber sowie Erythrozyten geprüft. (Erythrozyten im Häm-agglutinationstest.)

<u>Antigen</u>	<u>Anti-GKE-Antiserum</u>	<u>Anti-Trfl.-Antiserum</u>	<u>NKS</u>
Erythrozyten:	1 Titer 1:8	1 Titer 1:16	-
HS:	keine Reaktion	keine Reaktion	-
Leber inakt.:	1 Titer 1:8	1 Titer 1:32	-
Leber nicht inakt.:	Keine Reaktion	1 Titer 1:16 1 Titer 1: 2	-
Kollagen:	Keine Reaktion	keine Reaktion	keine Reaktion
GKE:	Keine Reaktion	-	keine Reaktion
Trfl.:	-	keine Reaktion	keine Reaktion

Das obige Schema gibt die in den vorangehenden OUCHTERLONY-Tests gefundenen Reaktionen der eingesetzten Antigene und Antisera wieder.

Die Antiseren wurden n a c h Absorbition mit Humanserum, Leber sowie Erythrozyten geprüft. (Erythrozyten im Hämagglutinationstest.)

Nachdem in unseren absorbierten Antiseren keine Antikörper auf lösliches Kollagen nachgewiesen werden konnten, und die spezifischen Antikörpertiter auf Gehörknöchelchen- und Trommelfellextrakt für sehr niedrig gehalten wurden, versuchten wir, die Antiseren mittels einer Vakuumflasche einzuengen. Danach sollte der OUCHTERLONY-Test mit einem "konzentrierten" Antiserum durchgeführt werden. Es sollte nun die Prüfung auf spezifische Antikörper gegen Gehörknöchelchen- bzw. Trommelfellextrakt erfolgen. Wir vermuteten, daß das Antiserum durch die wiederholten Absorptionen mit Erythrozyten um ca. ein Viertel verdünnt wurde. Die Antiseren wurden in semipermeable Membranen gefüllt und über 24 Stunden einem Vakuum ausgesetzt: Es erfolgte dadurch eine Reduktion der Volumina der beiden Antiseren um jeweils ein Drittel. Wir führten nun einen OUCHTERLONY-Test auf eine spezifische Reaktion zwischen unseren absorbierten Antiseren und Gehörknöchelchen- bzw. Trommelfellextrakt als Antigen durch. Hierbei ließen sich keine Präzipitate beobachten. Ein parallel laufender Test der nicht absorbierten Antiseren und dem entsprechenden Antigenen zeigte je eine Präzipitationslinie bei der Konzentration 1:1 .

Zum Ausschluß einer auf kreuzreagierenden Antikörpern (Antikörper, die antigene Determinanten auf zwei verschiedenen antigenen Substanzen finden) beruhenden Reaktion testeten wir normales Kaninchenserum gegen Gehörknöchelchen- und Trommelfellextrakt als Antigene: Hierbei zeigten sich keine Präzipitate!

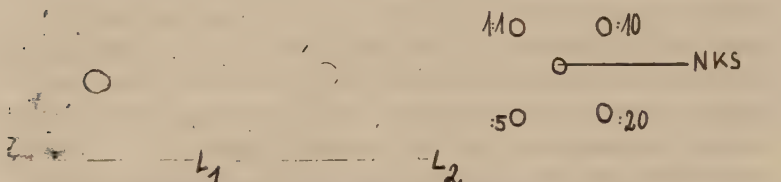
Es ließ sich zu dem Zeitpunkt also feststellen, daß unsere Antiseren wohl Antikörper gegen Erythrozyten, Humanserum und menschliches Gewebe enthielten, was wir bei unserer Immunisierung im xenogenen System auch erwartet hatten, eine s p e z i f i s c h e Immunantwort auf die Antigene

Gehörknöchelchen- bzw. Trommelfellextrakt hatte jedoch nicht stattgefunden.

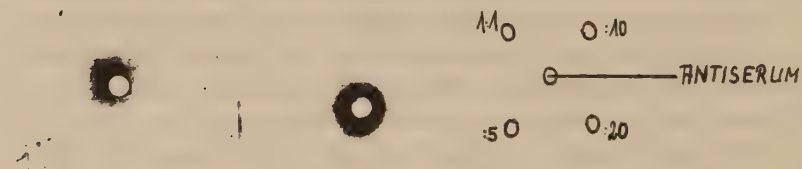
Wie bereits eingangs erwähnt, könnten bei der Immunisierung Störfaktoren durch Immunparalyse oder Enhancement aufgetreten sein, so daß auf evtl. schwache antigene Determinanten im Trommelfell oder den Gehörknöchelchen keine Immunantwort gebildet werden konnte.

Eine denkbare Möglichkeit, von vornherein eine spezifische Immunantwort zu erzeugen, bestünde in folgendem Versuch: Wenn man neugeborenen Meerschweinchen eine Überdosis der starken Antigene Erythrozyten, Serum und Lebergewebe vom Menschen injizierte, entstünde somit eine Immunparalyse gegen die genannten Antigene. Ein späterer antigener Reiz würde seitens der Erythrozyten, des Serums und des Lebergewebes keine Immunantwort mehr erzeugen. Wenn man auf diese Weise vorbehandelte Tiere mit Gehörknöchelchen- bzw. Trommelfellextrakt immunisiert, könnten die Tiere nur noch Antikörper gegen spezifische Antigene von Gehörknöchelchen- bzw. Trommelfellextrakt bilden. Die o.a. starken Antigene würden die Immunantwort auf schwache Antigene z.B. Kollagen nicht stören. Dieses denkbare Modell sollte zur Klärung der antigenen Determinanten in einem späteren Versuch durchgeführt werden. (Mündl. Mitt. Prof. Dr. Hammer, Freiburg)

β) Reaktionen der Antiseren n a c h Absorbtion im
OUCHTERLONY



Nr	Antiserum	Antigen	Reaktion im OUCHTERLONY
L ₁	NKS	GKE	keine Reaktion
L ₂	NKS	Trfl.	keine Reaktion

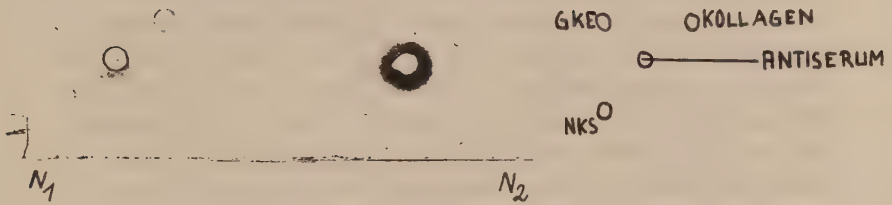


Nr	Antiserum	Antigen	Reaktion im OUCHTERLONY
M ₁	GKE abs.	GKE	keine Reaktion
M ₂	Trfl. abs.	Trfl.	keine Reaktion

Die Ouchterlony Teste Nr. L₁ und L₂ sollten evtl. Kreuzreaktionen des Gehörknöchelchen bzw. Trommelfellextraktes mit normalen Kaninchenserum aufzeigen. Es bot sich allerdings keine Reaktion.

Die Ouchterlony Teste Nr. M₁ und M₂ sollten evtl. spezifische Reaktionen der absorbierten Antisera mit den Antigenen Gehörknöchelchen- bzw. Trommelfellextrakt aufzeigen. Es fanden sich jedoch keine Präzipitate.

Reaktionen der Antiseren n a c h Absorbtion im
OUCHTERLONY



<u>Nr</u>	<u>Antiserum</u>	<u>Antigen</u>	<u>Reaktion im OUCHTERLONY</u>
N_1	GKE abs., Kol.	GKE Trfl.	keine Reaktion
N_2	Trfl. abs., Kol.	GKE Trfl.	keine Reaktion

Im obigen Ouchterlony-Test sollten evtl. kreuzreagierende Antikörper nachgewiesen werden. Jedoch trotz Einsatz von konzentrierter Antigene (10 mg/ml) fanden sich keine Präzipitate.

D. Histologische Ergebnisse:

Es wurde bereits erwähnt, daß wir unseren Versuchstieren nach dem Entbluten aus den regionalen Lymphknoten sowie aus der Haut der Injektionsstellen histologische Proben entnommen haben, um zelluläre Immunreaktionen aufzuweisen.

Die Kaninchen erhielten innerhalb von 40 Tagen zwei Fremdeinweißinjektionen (Gehörknöchelchen- oder Trommelfellextrakt vom Menschen) pro Injektionsstelle: Wir erwarteten daher im histologischen Bild massive Zeichen einer chronischen Entzündung mit Rundzellinfiltraten im Sinne einer Immunreaktion. In den regionalen Lymphknoten vermuteten wir eine erhöhte Teilungsaktivität von lymphoider Zellen mit großen voluminösen Kernen entsprechend einer Bereitstellung von immunkompetenten Zellen.

1. Bei unserer histologischen Untersuchung fanden wir eine starke plasmazelluläre Reaktion die auf eine Aktivierung des B-Zellsystems hinweist.
2. Dieser histologische Befund entspricht auch den hohen Antikörpertitern gegen Erythrozyten, Serum und Lebergewebe vom Menschen, die wir bei unseren serologischen Untersuchungen nachgewiesen haben.
3. Weiterhin bemerkten wir deutliche Entzündungszeichen in Form von infiltrierenden mononukleären Zellen und Fibrinablagerungen.
4. Die begleitende granulomatöse Proliferation von Epitheloid- und Riesenzellen ist wohl durch das zusätzlich zu den Trommelfell- und Gehörknöchelchenhomogenaten injizierte komplette Freundschs Adjuvans stimuliert worden.
5. Dagegen fanden wir nur eine minimale lymphozytäre Reaktion. Wir vermuteten, daß eine zelluläre Immun-

reaktion durch eine überschüssende humorale Reaktion behindert wurde. Außerdem könnte die zelluläre Immunreaktion deshalb schwach ausgefallen sein, weil durch die Lyophilisierung des injizierten Substrats fremde Zellstrukturen zerstört werden, so daß eine zellvermittelte Immunreaktion des Versuchstieres nur in geringem Umfang ausgelöst wurde.

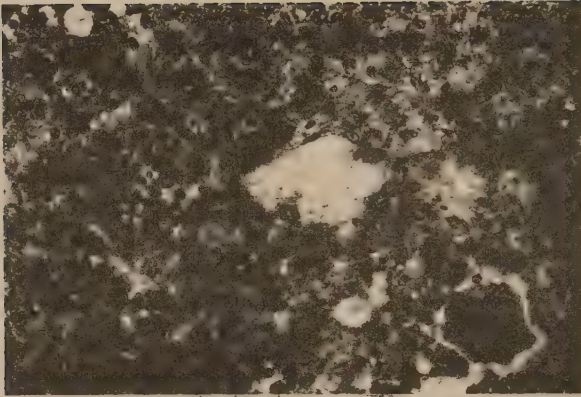


Abb. 1: Histologischer Schnitt der Subcutis eines Kaninchens 40 Tage nach zweimaliger Injektion von O s s i c u l a - H o m o g e n a t und komplettem Freundschem Adjuvans. Es zeigt sich eine plasmazelluläre und histiozytäre exsudative entzündliche Reaktion mit Übergang in eine granulierende Entzündung entsprechend einer Überempfindlichkeit vom Spättyp. Epitheloid- und vereinzelt Riesenzellen bilden eine Reaktion auf das mitinjizierte komplette Freundschsche Adjuvans. (Vergrößerung 40 fach)

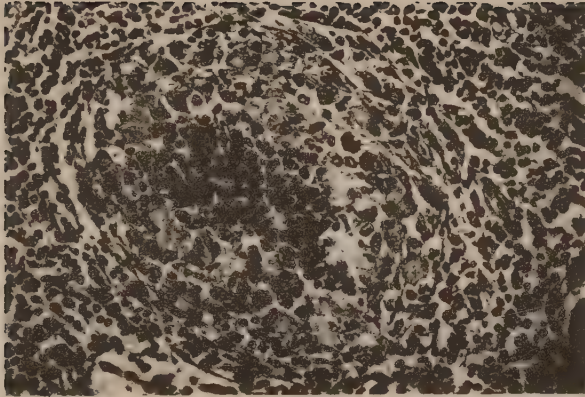


Abb. 2: Histologischer Schnitt der Subcutis eines Kaninchens 40 Tage nach zweimaliger Injektion von Trommelfell-Homogenat und komplettem Freundschens Adjuvans. Auch hier findet sich eine granulozytäre, plasmazelluläre und histiozytäre exsudative Reaktion entsprechend einer Überempfindlichkeit vom Spättyp. Deutlich erscheint die granulierende Entzündung, mit frischen Infiltraten im Zentrum des Bildes. (Vergrößerung 40 fach)

C. SCHLUSSTEIL:

1. Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse.

Nach den ersten Transplantationen glaubten zahlreiche Autoren, das Mittelohr sei aufgrund seines Hohlraumsystems mit geringer Ernährung und feinen Kontaktstellen der Gehörknöchelchen untereinander und zur Paukenhöhle ein für die Transplantation besonders günstiger Ort. Immunologische Abwehrreaktionen wurden zwar diskutiert, aber nie nachgewiesen. Die antigenen Determinanten von Gehörknöchelchen- und Trommelfellextrakt im xenogenen System zu untersuchen, war Gegenstand unserer experimentellen Untersuchungen. Wir unternahmen unseren Versuch deshalb im xenogenen System, weil evtl. schwache antigene Determinanten dadurch leichter nachzuweisen sind.

Wir immunisierten Kaninchen mit Gehörknöchelchen- und Trommelfellextrakt an mehreren für die Immunantwort besonders günstigen Injektionsstellen. Der Nachweis von humoralen Antikörpern gegen Homogenate aus frischen menschlichen Trommelfellen und frischen Gehörknöchelchen führten wir nach einem Immunisierungsvorgang am Kaninchen durch. Bei der serologischen Auswertung zeigten die Vor- teste hohe Titer gegen humane Erythrocyten, Humanserum und Lebergewebe. Wir versuchten, im OUCHTERLONY nach Absorbition unserer gewonnenen Antiseren, spezifische Antikörper gegen Gehörknöchelchen- und Trommelfellextrakt vom Menschen nachzuweisen. Außerdem isolierten wir aus menschlichen Trommelfellen lösliches Kollagen, um evtl. gegen diese Substanz gebildete Antikörper nachzuweisen. Nachdem eine ausreichende Absorbition gegen mitübertragene humane Immunogene wie Gewebs- und Blutgruppenantigene vom Menschen erfolgt war, ließen sich weder

Antigen-Antikörper-Präzipitate gegen Gehörknöchelchenextrakt noch gegen Trommelfellextrakt nachweisen. Auch beim OUCHTERLONY-Test mit isoliertem löslichen Kollagen aus menschlichen Trommelfellen ließ sich keine Antikörperreaktion auslösen. Nicht ausgeschlossen erscheint jedoch, daß bei den Absorptionsvorgängen kreuzreagierende spezifische Antikörper eliminiert wurden.

2. Schlußfolgerung:

Zusammenfassend läßt sich folgendes feststellen:

- a) Eine spezifische humorale Immunantwort auf Gehörknöchelchenextrakt und Trommelfellextrakt vom Menschen konnten wir im Tierversuch mittels OUCHTERLONY-Technik nicht nachweisen. Ob im allogenen System z.B. bei einer Transplantation von Mensch auf Mensch eine spezifische humorale Immunantwort induziert wird, erscheint jedoch nicht unmöglich, da humorale und zelluläre Immunreaktion einander bedingen.
- b) Auch gegen lösliches Kollagen aus Gehörknöchelchen- und Trommelfellextrakt ließen sich im xenogenen System keine präzipitierenden Antikörper finden. Dies erscheint deshalb möglich, weil kollagenes Material vom Menschen auch im xenogenen System nur schwach antigen wirkt. Resorption und funktioneller Ersatz von nativem Kollagen treten nur langsam auf und bewirken eine nur sehr verzögerte Immunreaktion.
- c) Die heftige Antikörperbildung gegen Erythrozyten, Serum und Gewebe vom Menschen ist im xenogenen System zu erwarten, da jede Substanz für sich stark antigen und immunogen ist.
Ob diese Substanzen auch im allogenen System antigen wirken, hängt vom Verwandtschaftsgrad der Blutgruppe und des Histiotyps (HL-A Typ) ab, und wird vom Grad der Vorsensibilisierung bestimmt.

Prinzipiell müßte nach diesen Erkenntnissen die allogene Transplantation von konservierten Gehörknöchelchen- und Trommelfelleextrakt ohne stärkere immunologische Entzündungsreaktion möglich sein. Zudem hängt der funktions-tüchtige Einbau von homostatischem Stützgewebe bekanntlich weniger von der Vitalität des Transplantatgewebes als den mechanischen Einflüssen am Einpflanzungsort ab, so daß eine mögliche Antigen-Antikörper-Reaktion nur eine geringe Rolle spielen dürfte. Die aus Langzeitstudien bekannten langsam ablaufenden immunologisch bedingten entzündlichen Prozesse, könnten nach unseren Versuchsergebnissen im allo enen Trans-plantat nur durch weitgehende Gleichheit der Transplantations-antigene oder besser gesagt der Histokompatibilität ver-mieden werden. Allerdings ist wohl eine geringe entzündliche Reaktion als Reiz zum Umbau eines Allo-Transplantates im Schalleitungsapparat notwendig, während das Allo-Trans-plantat selbst als "Schiene" für das wachsende körper-eigene Gewebe dient.

D. LITERATUR-VERZEICHNIS

- ABOTT, L.C.: The evaluation of cortical and cancellous as grafting material.
J. Bone Jt. Surg. A 29 (1947) 381
- ALGIRE, G.H.: Growth of cells in vivo in diffusion chamb.
- WEAVER, G.M.: Survival of homografts in immunized mice.
- PREHN, R.T.: J.nat. Cancer Inst. 15 (1954) 493
Zit. nach Schweiberer
- ALLGÖWER, M.: Some immunological aspects of auto- and homografts in rabbits, tested by in vivo and in vitro techniques.
Plast. reconstr. Surg. 9 (1952) 1
- ANTONI-CANDELA, F.: Homogreffes tympano-ossiculaires.
Acta Oto-Rhino-Laryng. Belgica 24 (1970) 111
- AUSTIN, D.F.: A new system of tympanoplasty using vein graft.
Laryngoscope (St. Louis) 71 (1961) 596
- AUSTIN, D.F.: Ossicular reconstruction
Acta Oto-Rhino-Laryng. Belgica 24 (1970) 86
- AVRAMEAS, S.: The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents (1968)
- AXHAUSEN, G.: Histologische Untersuchungen über Knochentransplantationen am Menschen.
Dtsch. Z. Chir. 91 (1908) 388, Zit. n. W. Axhausen 1950

- AXHAUSEN, G.: Die pathologisch-anatomischen Grundlagen der Lehre von der freien Knochen-Transplantation beim Menschen und Tier. Med. klin. Beih. 2 (1908) 23, Zit. n. W. Axhausen
- AXHAUSEN, W.: Die Bedeutung der Individual- und Artspezifität der Gewebe für die freie Knochenüberpflanzung. Hefte zur Unfallheilkunde 72 (1962) Springer Verlag Berlin
- BANDTLOW, O.: Experimentelle Untersuchungen zur plastischen Wiederherstellung des Trommelfells. Verl. A. Hühig, Heidelberg, 1967
- BECKER, U.: Immunchemie des Kollagens Diss. Druck Frank, München (1972)
- BIRCH, D.A.: Preliminary communication: myringoplasty performed with a peritoneum homograft. J. Laryng. (London) 75 (1961) 922
- BILLINGHAM, R.E.: Actively acquired tolerance of foreign cells. Nature (London) 172, 603 (1953)
- BRENT, L.: Homograft tympanic membrane transplant in myringoplasty. Acta Oto-Rhino-Laryng. Belgica 24 (1970) 38
- BURIAN, K.: Vergleichende klinische und histologische Untersuchungen über das Verhalten von frischen und konservierten homoioplastischen Cutistransplantaten in Ohroperationshöhlen. Mschr. Ohrenheilkunde 89 (1955) 21

- BURIAN, K.: Vergleichende klinische Untersuchungen an autoplastischen und konservierten homoioplastischen Hauttransplantaten bei je 75 Fällen von Tympanoplastiken. Arch. Ohr-Nase-Kehlk.-Heilk. 171, (1957/58) 116
- BURWELL, R.G.: Studies in the Transplantation of Bone. J. Bone Jt. Surg. B. 45 (1963) 386
- BURWELL, R.G.: Studies in the Transplantation of Bone. J. Bone Jt. Surg. B. 46 (1964) 110
- CHALMERS, J.: Transplantation immunity in bone homografting. J. Bone Jt. Surg. B 41 (1959) 160
- CHOEN, J.: Bone and cartilage formation by periosteum.
- LACROIX, P.: Issay of experimental autogenous grafts. J. Bone Jt. Surg. A 37 (1955) 717
- CONWAY, H.: Observation on the development of circulation in skin grafts. I. Technique of adaption of the transparent chamber technique to study the circulation in skin grafts. Plast. Reconstr. Surg. 8 (1951) 194
- CORNISH, A.: Zit. n. E. Brandow, Acta Oto-Rhino-Laryng. Belgica 24 (1970) 38
- DAWKINS, R.S.: Experimental middle ear transplants. Acta Oto-Rhino-Laryng. Belgica 24 (1970) 140
- DEHM, A.: L'induction dans les homogreffes osseuses. Acta Oto-Rhino-Laryng. Belgica 24 (1970) 73

- EBNER, v., V.: Handbuch der mikroskopischen Anatomie von Koelliker, Bd. 3, S. 889 (1903).
Zit. nach W. Kolmer, Handb. der mikroskop. Anatomie des Menschen, 1. Teil Haut- u. Sinnesorgane, Berlin, Springer - Verl. 1927
- ECKE, H.: Neue Wege der quantitativen Bestimmung der ossären Regeneration an Knochen-transplantaten.
Langenbecks Arch. klin. Chir. 319 (1967) 448
- GLANNINGER, J.: Ein Fall von Stapesplastik unter Verwendung eines kältekonservierten Homoiotransplantates mit 6 Jahre anhaltendem Hörerfolg
Z. Laryng. 46 (1967) 760
- HALL, A.: Autotransplantation with buccal mucous graft in central perforations of the tympanic membrane with intact ossicular chain.
Acta Oto-Laryng. (Stockh.) Suppl. 140 1958, 286
- HAMMER, D.K.: Mündl. Mitt. 1975
Prof. Dr. Max-Planck-Inst. f. Immunbiologie, Freiburg
- HEERMANN, J.: Erfahrungen mit frei transplantiertem Fascien-Bindegewebe des Musculus temporalis bei Tympanoplastik und Verkleinerung der Radikalhöhle.
Knorpelhöhle vom Stapes zum unteren Trommelfellrand.
Z. Laryng. Rhinol. 41 (1962) 141

- HECK, W.E.: Vein graft myringoplasty.
Laryngoscope (St. Louis) 71 (1961)
847
- HILDYARD, V.H.: Ossicular homografts
Acta. Oto-Rhino-Laryng. Belgica 24
(1970) 83
- HOPPE-SEYLER, E.F.: Handbuch der physiolog.-pathol.-chem.
H. THIERFELDER: Analyse. Bd. II. Bausteine des Tier-
körpers.
Springer - Verlag, Berlin, 1962, 450
- HOUSE, W.F.: Homograft transplantat of the middle
ear.
Acta Oto-Rhino-Laryng. Belgica 24,
(1970) 132
- JANSEN, C.: On the use of perichondrium in
tympanoplasty.
Arch. Ohr.-Nasen-Kehlkopfleiden 182
(1963) 610
- KASTENBAUER, E.R.: Tierexperimentelle Untersuchungen über
das immunologische Verhalten allogener
Gehörknöchelchen-Transplantate
Arch. klin. Exp. Ohr.-Nas. u. Kehlk.
Heilk. 201, 332 - 350 (1972) Springer -
Verlag
- KASTENBAUER, E.R.: Die Umbauvorgänge in autogenen und
allogenen Gehörknöchelchen-Transplantaten
im Tierexperiment
Arch. kl. exp. Ohr.-Nas. u. Kehlk.
Heilk. 203, 58 - 69 (1972) Springer-Verlag

- KASTENBAUER, E.R.: Experimentelle Untersuchungen zur osteogenetischen Leistungsfähigkeit der Paukenhöhle und der Gehörknöchelchen nach ihrer orthotopen und heterotopen Transplantation.
Arch. klin. exp. Ohr.-Nas.- u. Kehlk. Heilk. 203, 70 - 80, (1972) Springer - Verlag
- KASTENBAUER, E.R.: Die Transplantation menschlicher Trommelfelle im allogenen und xenogenen System.
Arch. klin. exp. Ohr.-Nas.- u. Kehlk. Heilk. 203, 217 - 224, (1973) Springer - Verlag
- KASTENBAUER, E.R.: Der Einfluß des Konservierungsmittels Cialit auf die Proteinlöslichkeit und die Antigenizität von allogenen und xenogenen Gehörknöchelchen- und Trommelfelltransplantaten
Arch. klin. exp. Ohr.-Nas.- u. Kehlk. Heilk. 203, 225 - 231 (1973) Springer-Verlag
- KLEY, W.: Fascia temporalis zum Verschuß von Trommelfellperforationen bei Tympanoplastik.
Mschr. Ohrenheilkunde 97 (1963) 55
- KOCH, H.: Experimentelle Studien über Knochenregeneration
Bruns Beitr. klin. Chir. 132 (1924) 364

- KOLMER, B.: Handbuch der mikroskop. Anatomie des Menschen.
I. Teil, Haut- und Sinnesorgane, Springer-Verlag, Berlin 1927, 254
- KRAMER, B.M.: The vein graft in reconstructive ear surgery.
Laryngoscope (St. Louis) 71 (1961) 854
- LACHER, G.: Banque d'osselets pour homogreffes en chirurgie tympanoplastique
C. Hanser Verlag, München, 1964
- MARQUET, J.: Problemes particuliers se rapportant aux homogreffes tympano-ossiculaires.
Acta Oto-Rhino-Laryng. Belgica 24 (1970) 99
- MATTHI, H.: Über freie Transplantation von Knochen-spongiosa
Langenbecks Arch. klin. Chir. 168 (1932) 236
- MAWSON, S.: Tympano-ossicular homografts.
Acta Oto-Rhino-Laryng. Belgica 24 (1970) 125
- MEDAWAR, P.B.: Preservation and Transplantation of normal tissues.
Ciba Found. Symp., London, 1954
- PLESTER, D.: Tympanic membrane homografts in ear surgery.
Acta Oto-Rhino-Laryng. Belgica 24 (1970) 34

- PRADES, J.: Le cartilage homologue dans la chirurgie reconstructive de l'oreille moyenne.
Acta Oto-Rhino-Laryng. Belgica 24 (1970) 66
- ROSIN, A.: The fate of rat bone marrow, spleen and periosteum cultivated in vivo in the diffusion chamber with special reference to the bone formation.
Exp. Cell. Res. 29 (1963) 176
Zit. n. Schweiberer
- SCHENK, R.: Zur Histologie der primären Knochenheilung.
H. WILLENEGGER: Langenbecks Arch. klin. Chir. 308 (1964) 440
- SCHOBEL, H.: Zur Trommelfellplastik mit freien und gestielten Fascienlappen und Wiederherstellung des Schalleitungsapparates.
Zbl. f. HNO-Heilk. 77 (1960) 287
- SCHWEIBERER, L.: Experimentelle Untersuchungen von Knochentransplantaten mit unveränderter und mit denaturierter Knochengrundsubstanz.
Hefte zur Unfallheilkunde 103 (1970)
Springer - Verlag, Berlin 1970,
- SEIFFERT, K.E.: Biologische Grundlagen der homologen Transplantationen konservierter Bindegewebe.
Hefte zur Unfallheilkunde 93 (1967)
Springer - Verlag, Berlin 1967

- SEIFFERT, K.E.: Biological aspects of collagenous homografts.
Acta Oto-Rhino-Laryng. Belgica 24 (1970) 27
- STEFFEN, C.: Untersuchungen über die Heterogenität
R. TIMPL: der Antigenstruktur von Proteinen und der Antikörperfraktionen in Immunseren.
Z. Immunforsch. 127 (1964) 362
- STORRS, L.A.: Myringoplasty with use of fascia grafts.
Arch. Oto-Laryng. 74 (1961) 45
- STROEHMANN, J.: Immunologie der Organtransplantation.
K.O. VORLAENDER: Erg. H.z.Z. Kreisl. Forsch. 4, 2 (1967) 43
- TABB, H.G.: Closure of perforations of the tympanic membrane by vein grafts. Preliminary report of twenty cases.
Laryngoscope (St. Louis) 70 (1960) 271
- TIMPL, R.: Antigene Eigenschaften der Bindegewebsstrukturproteine.
Med. Mitt. (Melsungen) Bd. 43, 112, (1969) S. 29 -38
- TOBECK, A.: Steigbügel Verstorbener als Steigbügelersatz bei der Otoskleroseoperation.
Z. Laryng. Rhinol. 41 (1962) 31
- TROMBETTA, A.: Perforations of tympanic membrane and tympanoplasty. Closure by pericardium, a preliminary report of 9 cases.
Arch. Otolaryng. (Chicago) 77 (1963) 81

- WASSERMANN, F.: Die Differenzierung der lebendigen Masse.
Handbuch d. mikr. Anatom. d. Menschen,
Berlin 1929
Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 65 (1959)
852
- WEICHSELBAUMER, W.: Transplantation der Ossicula
Msch. Ohrenheilk. 95 (1961) 375
- ROITT, I.: Essential Immunology Blackwell Scientific
Publication
(1972)
- BILLINGHAM, R.: Federation Proceedings
Vol. 34, Nr. 8, July 1975
- BACH, F.H.: New England Journal of Medicine
July 1976
The Major Histocompatibility Complex-
Genetics and Biology

Die vorliegende Arbeit wurde an der Universitäts-Hals-Nasen-Ohrenklinik München durchgeführt. Herrn Prof. Dr. H.H. Naumann danke ich für die Überlassung des Themas, Herrn Priv. - Doz. Dr. E. Kastenbauer für die Unterstützung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. K. Hochstrasser danke ich für die Betreuung der Arbeit, für seine Anregungen und Ratschläge.

Zu Dank verpflichtet bin ich ferner Herrn Prof. Dr. D.K. Hammer, sowie Herrn K. Bartsch, für die Betreuung meiner experimentellen Untersuchungen am Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg/Breisgau.

LEBENS LAUF:

Am 7. Juni 1945 wurde ich, als ältester Sohn des Berufs-offiziers Otto Reichardt und seiner Ehefrau Rita in Schwanebeck, Kreis Halberstadt geboren.

Nach Besuch der Volksschule in Bad Harzburg trat ich 1957 in das dortige Gymnasium ein, wo ich im Frühjahr 1965 die Reifeprüfung ablegte.

Danach erfolgte meine Einberufung zum Wehrdienst, den ich bis zum Herbst 1966 ableistete.

Im Anschluß daran nahm ich das Studium der Medizin an der Universität Hamburg auf. Nach einem einjährigen Auslandsaufenthalt als Stipendiat, legte ich im Sommer 1973 mein Staatsexamen in München ab.

Nachdem ich meine Medizinalassistentenzeit absolviert hatte, erhielt ich im Januar 1975 meine Approbation.

Seither arbeite ich unter Anleitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. E. Kastenbauer an der vorliegenden Arbeit, die durch ein Doktorandenstipendium gefördert wurde.

